

ANNALES DE L'INSTITUT PASTEUR

IMMUNITÉ ET PRÉMUNITION

par EDM. SERGENT et L. PARROT.

(*Institut Pasteur d'Algérie.*)

Lorsqu'un organisme a guéri d'une première atteinte d'une maladie infectieuse, il oppose à toute nouvelle contamination une résistance que l'on appelle immunité. Notre dessein est de montrer ici, à nouveau, qu'il y a deux sortes d'immunité acquise et qu'il convient, pour préciser la pensée, de les désigner par des termes différents (1). Cette distinction permettra, en outre, d'écarter certains espoirs chimériques, d'expliquer l'insuccès d'anciennes tentatives d'immunisation et de suggérer des recherches en vue de nouvelles méthodes de vaccination.

*
* *

L'évolution d'une primo-infection comprend trois moments principaux : la pénétration du microbe dans l'organisme ou contamination ; l'accès plus ou moins aigu qui en résulte ou *crise* ; la guérison ou disparition totale non seulement des symptômes morbides, mais encore des microbes agresseurs. Entre ces trois moments, deux stades pendant lesquels l'infec-

(1) Voir : *Bull. Soc. path. exot.*, 17, janvier 1924, p. 37.

tion « couve » et reste latente : ce sont, entre la contamination et l'accès aigu, l'incubation ou *phase procritique* ; entre l'accès aigu et la guérison, la *phase* que l'on peut appeler *métacritique*. Toute maladie infectieuse comporte une phase d'incubation procritique, de durée variable, d'ailleurs, suivant l'espèce nosologique ; mais, seules, les maladies infectieuses dites *chroniques* possèdent une phase latente métacritique. Or, la résistance conférée par une première atteinte, l'immunité, présente des caractères différents suivant l'existence ou l'absence de cette phase métacritique entre l'accès et la guérison, au sens que nous venons d'indiquer. Il y a donc intérêt à préciser d'abord la nature et les modalités de l'infection latente métacritique.

L'INFECTION LATENTE. — Une infection est dite *latente* lorsqu'elle ne se manifeste par aucun symptôme perceptible, lorsqu'elle ne tombe pas directement sous les sens. En réalité, l'infection ne reste occulte que dans la mesure où les moyens d'investigation et de diagnostic dont le médecin dispose demeurent imparfaits. Les progrès de la technique diminuent progressivement le nombre de ces infections cachées. Des signes morbides ou des lésions anatomiques que le malade n'accuse pas nous sont souvent révélés par certains artifices, par l'auscultation, la radioscopie, etc. Les méthodes microbiologiques — recherche microscopique du germe, ensemencement dans des milieux de culture appropriés, inoculation à des animaux sensibles, réactions humorales — peuvent enfin apporter la preuve formelle de l'origine et de la nature du mal. A cet égard, les exemples abondent.

Un bovin présente tous les caractères somatiques du parfait état de santé. Cependant, l'examen microscopique prolongé du sang de cet animal révèle qu'il est infecté par de rares piroplasmes de l'espèce *Piroplasma bigeminum*, et ce sang, inoculé à un bovin neuf, déterminera chez ce dernier un accès aigu, patent, de piroplasmose. A supposer que le microscope n'existât point, l'infection latente du premier bovin fût, dès l'abord, restée ignorée ; à supposer encore que la taille du parasite, *Piroplasma bigeminum*, n'atteigne pas la limite inférieure de visibilité au microscope, comme il arrive avec certains virus dits filtrants, cette infection latente — dont l'existence est prouvée par les conséquences cliniques de l'inoculation de sang infecté à des sujets neufs — pourrait être méconnue.

L'examen microscopique ne décèle aucun parasite dans le sang d'un pas-

sereau indigène de l'Afrique du Nord. L'inoculation de quelques gouttes du sang de cet oiseau apparemment sain à un canari né en cage, sûrement indemne, donne à celui-ci un paludisme intense, démontrant ainsi l'infection du premier. C'est l'*isodiagnostic*, procédé devenu indispensable dans les recherches approfondies sur les paludismes des animaux. La différence entre les deux résultats tient simplement à ce que l'examen microscopique porte sur quelques milliers de globules rouges seulement, tandis que la transfusion en utilise quelques milliards.

La très grande majorité des adultes sains, dans les grandes villes surtout, réagit à l'injection de tuberculine, témoignant ainsi qu'ils se trouvent porteurs de bacilles tuberculeux. Cette infection tuberculeuse latente, si discrète qu'elle ne se traduit par aucun signe morbide, resterait cachée si l'on ne disposait pas du réactif que constitue la tuberculine.

L'INFECTION LATENTE D'EMBLÉE. — Il arrive que l'accès aigu de première invasion passe inaperçu. L'infection s'installe silencieusement, sans crise révélatrice. C'est ce que l'on a appelé l'infection latente d'emblée [1910] (1). Dans ce cas, la phase procritique et la phase métacritique se rejoignent et se confondent.

Certaines infections latentes d'emblée sont transmissibles en série avec le même caractère de microbisme occulte, ne déterminant pas de signes cliniques et révélé seulement par les méthodes de recherche microbiologiques.

Ainsi, un petit piroplasma du bœuf, *Theileria mutans*, ne provoque jamais de symptômes morbides chez les bovins qu'il infecte, bien qu'on puisse observer, dans le sang de la circulation périphérique, plus de 100 parasites pour 1.000 globules rouges. Il en est de même de *Anaplasma centrale*, autre piroplasma du bœuf, chez lequel il provoque simplement un accès parasitaire, sans accès clinique. Or, ces deux infections se transmettent indéfiniment, dans la nature ou au laboratoire, sans qu'il y ait jamais exaltation de la virulence des germes et apparition de désordres généraux. L'infection reste occulte à tous les passages.

* * *

L'existence ou l'absence d'une phase d'infection latente au cours d'une maladie infectieuse dépend d'un caractère spécifique des microbes pathogènes : leur compatibilité ou incompatibilité avec l'organisme qu'ils attaquent.

La vie de certains microbes pathogènes [rougeole, etc.] (2)

(1) C. R. Ac. Sc., 151, 1^{er} août 1910, p. 407.

(2) Exemples : rougeole, scarlatine, variole, varicelle, fièvre jaune, typhus exanthématique, fièvre boutonneuse, fièvre typhoïde, oreillons, dengue, polio-

est incompatible avec la vie de l'organisme infecté : ils tuent ou sont tués. Lorsque l'organisme triomphe, la guérison suit immédiatement la fin de l'accès aigu : il n'y a pas d'infection latente métacritique. La réaction de l'organisme est tellement forte qu'elle produit un excès d'anticorps et que les effets s'en prolongent longtemps après la guérison, sous la forme de l'« immunité », qui empêche les réinoculations de produire des récidives.

Au contraire, la vie d'autres microbes pathogènes [syphilis, etc.] (1), est compatible avec celle de l'organisme attaqué : l'accès de première invasion, s'il n'entraîne pas la mort de l'organisme, aboutit à une sorte de compromis entre le microbe et son hôte, qui arrivent à se tolérer réciproquement. Le parasitisme devient alors une sorte de symbiose, le parasite survit, au ralenti ; l'infection latente métacritique s'installe et ne cesse qu'à la longue, par l'action macrophagocytaire. La guérison, n'étant pas la conséquence d'une réaction prompte et énergique de l'organisme, ne s'accompagne pas de la formation d'anticorps abondants. C'est pourquoi la guérison ne laisse aucune immunité : une réinoculation peut provoquer une récidive.

Il faut donc abandonner l'espoir d'obtenir une véritable immunité contre les réinoculations après la guérison des maladies à infection latente. Mais une chance subsiste : *tant que dure l'infection latente*, toute agression nouvelle par un virus de même espèce se heurte à une résistance : les deux virus ne se surajoutent pas. Tout se passe comme si le premier excluait le second. La place reste au premier occupant.

A cet état particulier de résistance, contemporain de l'infection et cessant avec elle, nous avons donné, en 1924, avec A. Donatien, le nom de *prémunition* (2) pour le bien distinguer de l'état réfractaire consécutif à la guérison des maladies infectieuses aiguës, de l'*immunité vraie*. *Prémunir* signifie

myélite épidémique, coqueluche, peste, tularémie, diphtérie, dysenterie, charbon, rouget du porc, choléra des poules, typhose aviaire, clavelée, variole porcine, peste bovine, peste porcine, maladie des jeunes chiens, péripneumonie des bovidés, fièvre aphteuse, etc.

(1) Exemples : syphilis, tuberculose, brucelloses, spirochètoses, paludismes, piroplasmoses, bartonelloses, trypanosomiasés, etc.

(2) Edm. SERGENT, L. PARROT et A. DONATIEN : Une question de terminologie : *immuniser* et *prémunir*. Bull. Soc. Path. exot., 17, janvier 1924, p. 37-38.

« munir par précaution, fortifier d'avance, mettre en garde contre », conformément à son étymologie : *præ*, auparavant, *munire* (de *mœnia* murs de défense). On peut remarquer que les mots *munus*, charge (d'où vient *immunité*, exemption de charges), et *mœnia* (d'où vient *prémunir*) ont sans doute une origine commune (Bréal et Bailly).

Vocabulaire comparé :

Nom d'état : *Immunité* :
Etat réfractaire post-infectieux.

Nom d'état : *Prémunition* :
Etat réfractaire co-infectieux.

Nom d'action : *Immunisation* :
Acte par lequel on met l'organisme en état de résister à une *réinfection*, comme s'il s'était guéri d'une atteinte spontanée de la maladie considérée.

Nom d'action : *Prémunition* :
Acte par lequel on procure la résistance à la *surinfection*, à la faveur d'une infection chronique provoquée

Immuniser.
Immunisé.
Immunisant.

Prémunir.
Prémuni.
Prémunissant (1) ou *prémunitif*.

En un mot, les maladies à prémunition peuvent récidiver après guérison, mais elles « ne se doublent pas » tant que l'infection existe. La prémunition représente, en quelque sorte, le résultat d'une « auto-microbiothérapie permanente », qui alerte continuellement les défenses organiques. La pullulation des microbes de première infection et des microbes de surinfection est inhibée ou ralentie, grâce à l'intervention constante de la phagocytose. Le système réticulo-endothélial est tenu sans cesse sur la brèche du fait même de la persistance des germes dans l'économie, de l'infection chronique (2).

*
* *

Une conclusion pratique découle de ces considérations.

Contre les maladies à infection latente, dont la guérison n'est jamais suivie d'immunité vraie, nous devons renoncer à

(1) Par analogie avec « immunisant », on dit parfois « prémunissant ». Il y a tout avantage à employer le terme correct de « prémunissant ».

(2) Aux catégories des maladies à immunité et des maladies à prémunition, il faut ajouter une troisième catégorie de maladies infectieuses : celles qui ne comportent ni immunité, ni prémunition. Elles sont dues à des bactéries pyogènes : pneumocoque, streptocoque, staphylocoque, gonocoque, bacille de Ducrey, bacille de Preisz-Nocard, etc.

une vaccination immunisante. Et, puisqu'on ne peut pas immuniser contre elles, il faut essayer de *prémunir*.

La prémunition artificielle a pour objet de rendre l'organisme rebelle aux surinfections grâce à une primo-infection provoquée, bénigne, et pour ainsi dire ménagée. Pour prémunir, il faut donc infecter; les virus-vaccins doivent être vivants. Grosse différence avec l'immunité vraie que l'on peut conférer par des vaccins tués, ou par des toxines, ou par des extraits bactériens.

Un autre caractère qui distingue la prémunition de l'immunité est que, dans les maladies à prémunition, le sérum ne renferme jamais d'anticorps en quantité notable; par suite, la sérothérapie n'y donne pas de résultats favorables: syphilis, tuberculose, paludisme, piroplasmoses, trypanosomiasés, etc.

Un inconvénient de la prémunition artificielle serait de créer de nouveaux réservoirs de virus. Employer des virus-vaccins vivants, c'est, en effet, risquer de répandre des virus contagieux, dont on doit craindre que la virulence ne s'exalte un jour ou l'autre. D'où deux règles pratiques: n'appliquer la prémunition par virus-vaccin à virulence instable que dans des pays où le mal existe déjà (tel est le cas de la prémunition contre la *Brucella* de Bang, de l'avortement épizootique des vaches). De préférence, chercher à obtenir des virus-vaccins qui ne soient pas contagieux (c'est ce que l'on a réussi à obtenir pour le B. C. G. et pour le virus-vaccin contre la theilériose bovine nord-africaine, comme on le verra plus loin).

*
* *

Quelques exemples mettront en lumière les caractères distinctifs des maladies à prémunition (1): *résistance à la surinfection*, traduite par l'atténuation marquée ou la suppression totale des effets d'une nouvelle contamination chez les sujets en état d'infection latente métacritique; *absence de résistance aux réinfections après la guérison*. Ces exemples montreront aussi que, d'après ces principes, on a pu instituer des procédés efficaces de prémunition artificielle, de vaccination prémunitive.

(1) On remarquera que, parmi ces exemples, aucun ne se rapporte à une infection par un ultravirus. Ce sont des infections bactériennes (microcoques, bacilles, spirochètes) ou à protozoaires.

PALUDISMES.

L'observation clinique et l'expérimentation montrent que des porteurs de *Plasmodium* résistent aux surinfections. La réaction d'un paludéen à une surinfection est parfois tout à fait nulle. D'autres fois, la réaction se traduit par un léger accès parasitaire, sans élévation thermique, ni manifestation morbide; elle ne serait pas apparente si l'on n'usait pas du microscope. Quand la réaction se manifeste par un accès à la fois clinique et parasitaire, il est tout à fait exceptionnel que cet accès ne revête une allure bénigne. La résistance au paludisme des indigènes d'un pays fiévreux est un exemple de prémunition acquise dès l'enfance et entretenue par réinoculations annuelles.

Si l'infection guérit, le sujet, contaminé à nouveau, fait un accès de paludisme aigu, normal. On voit des indigènes, dont la prémunition était entretenue dans leurs pays d'origine par des inoculations annuelles, guérir s'ils émigrent dans un pays sain, puis contracter derechef le paludisme une fois rentrés chez eux. L'étude du paludisme inoculé à des paralytiques généraux, pour des fins thérapeutiques, a confirmé ces données de l'observation. Les recherches expérimentales ont démontré également l'existence de la prémunition dans les paludismes des oiseaux, des singes.

On cite des cas d'immunité vraie *succédant* à la prémunition chez des paludéens, mais on peut toujours se demander s'il n'existe pas dans ces cas une infection latente qu'on n'a pas pu mettre en évidence avec les moyens de diagnostic dont on disposait. On connaît de très longs silences de l'infection plasmodiale chez l'homme. En somme, on peut dire qu'actuellement l'existence de la prémunition est prouvée dans le paludisme, et que celle de l'immunité vraie ne l'est pas encore.

Les paludismes présentent donc nettement le double caractère des maladies à prémunition : résistance à des surinfections pendant la période de microbisme latent; réceptivité complète dès la guérison obtenue.

VACCINATION. — Tous les essais de vaccination par des *Plasmodium* tués ou par des extraits cellulaires ont échoué. De

même, tous les essais de sérothérapie antipaludéenne ont abouti à des échecs. Ces résultats négatifs s'expliquent si l'on considère que le paludisme ne confère pas d'immunité vraie, qu'il représente une maladie à prémunition.

Au contraire, les virus-vaccins vivants permettent de conférer à des sujets neufs une prémunition efficace. Expérimentalement, la vaccination prémunitive est aisée à obtenir, et on peut en contrôler les suites par l'administration opportune des médicaments antipalustres.

En médecine humaine, on a reconnu qu'il est avantageux, pour les sujets destinés à vivre en pays à paludisme endémique, où le risque des réinoculations est grand, d'acquérir et de conserver la prémunition. Un paludéen guéri, c'est-à-dire débarrassé de ses *Plasmodium*, peut, s'il est piqué par un Anophèle porteur de sporozoïtes, présenter un accès pernicieux tout comme un sujet neuf; il est donc préférable que le paludéen conserve une infection latente, grâce à laquelle toute surinfection grave lui sera épargnée. C'est pourquoi la Commission du paludisme de la Société des Nations, dans son troisième Rapport général (S. P. James, juin 1933), indique l'intérêt qu'il y a, dans le traitement du paludisme, à ne pas supprimer complètement l'infection, afin de permettre au mécanisme de défense de l'organisme de rester en activité constante et de se développer progressivement. Il ne faut pas guérir trop vite et trop complètement le paludéen appelé à vivre en milieu palustre. Il a, bien au contraire, tout avantage à rester infecté, donc prémuni : c'est l'acclimatement sans risque.

PIROPLASMOSES.

Les maladies groupées sous ce nom et dues à des hématozoaires des genres *Piroplasma*, *Babesiella*, *Theileria*, *Anaplasma*, présentent, au plus haut degré, le phénomène de la résistance aux surinfections pendant la latence métacritique de l'infection. La contamination naturelle ou expérimentale d'un animal prémuni ne produit, le plus souvent, aucun accès clinique. On observe parfois un simple accès parasitaire, qui passerait inaperçu sans le microscope. La prémunition persiste souvent très longtemps (theilériose) et, parfois, pendant la vie

entière de l'animal (anaplasmoses). Les piroplasmoses dans lesquelles l'infection chronique est de moindre durée (piroplasmose vraie à *Piroplasma bigeminum*, babésiellose) ne laissent après la guérison aucune résistance contre les réinoculations, et les accès de récurrence peuvent être aussi violents que des accès de première invasion.

VACCINATION. — Les piroplasmoses présentent donc le type des maladies à prémunition, contre lesquelles, si aucune vaccination immunisante n'est possible, les procédés de vaccination prémunissante, au contraire, rendent de grands services.

En Afrique du Nord, la vaccination prémunitive des bovins contre les quatre piroplasmoses pathogènes du pays : piroplasmose vraie, babésiellose, anaplasmoses, theilériose, est entrée dans la pratique depuis onze ans. Les virus-vaccins sont constitués par du sang virulent prélevé à des bovins conservateurs de virus. Ce sont : soit des souches naturellement bénignes, gardées au laboratoire en infection pure sur des bovins et prélevées durant la phase chronique (piroplasmose vraie, babésiellose), ou bien au cours de l'accès aigu (theilériose), soit du virus prélevé aux donneurs au cours de l'incubation (anaplasmoses), soit un virus d'une espèce sans virulence (*Anaplasma centrale*) susceptible de conférer un certain degré de résistance contre une espèce voisine, très pathogène (*Anaplasma marginale*).

L'un des virus-vaccins, celui de la theilériose bovine, résout heureusement le problème de donner au vacciné une infection réelle, nécessaire, par définition, à l'établissement de la prémunition, sans créer pour cela un nouveau réservoir de virus. L'agent de cette grave maladie, *Theileria dispar*, est transmis dans la nature, en Afrique du Nord, par la tique *Hyalomma mauritanicum*. Le stade sexué du parasite se déroule chez la tique, hôte définitif, le stade asexué chez le bovin, hôte intermédiaire. *Theileria dispar* peut être transmis indéfiniment de bovin à bovin par transfusion de sang. Au cours de ces passages, l'évolution schizogonique de l'hématozoaire suffit à assurer la pérennité de l'espèce et l'infection successive de tous les bovins, avec une virulence remarquablement régulière. On constate, en revanche, que, dès les premiers pas-

sages de bovin infecté à bovin sain par transfusion de sang, le parasite cesse de produire des gamétocytes, et que le sang de ces bovins, uniquement parasités par des formes asexuées, est devenu incapable d'infecter les tiques. Ces bovins sont donc porteurs de germes prémunissants, mais *non contagieux*. La condition idéale de la prémunition est réalisée.

Les résultats obtenus sur plus de 15.000 bovins prémunis dans l'Afrique du Nord, depuis l'année 1924, contre les quatre piroplasmoses pathogènes du pays sont les suivants : tandis que, dans les régions infectées, les troupeaux non vaccinés perdent de 20 à 40 p. 100 de leurs effectifs, la moyenne des pertes, chez les animaux prémunis, est de 1 p. 100, à peine.

TRYPANOSOMIASES.

On a beaucoup discuté pour savoir si les trypanosomiasés sont des maladies à prémunition ou à immunité proprement dite. R. Koch a soutenu la première thèse; Laveran et Mesnil ont donné des arguments en faveur de la seconde, et ils concluent (1) que la simple guérison clinique « paraît rare en ce qui concerne les trypanosomes pathogènes » et que les ruminants considérés comme guéris microbiologiquement ont généralement l'immunité.

Les trypanosomiasés offrent, à maints égards, le caractère de maladies prémunissantes, bien qu'on puisse se demander si, dans certains cas, une véritable immunité ne succède pas à la prémunition. La preuve est difficile à faire de l'absence de tout germe dans l'organisme d'un ancien trypanosomé. Pratiquement, les trypanosomes pathogènes sont justiciables de la prémunition et non pas de l'immunisation.

VACCINATION. — Laveran et Mesnil, faisant allusion à quelques cas signalés par Mesnil, parlent dans leur *Traité* (2) d'animaux traités qui ne sont pas « stérilisés » complètement comme conséquence immédiate du traitement et qui résistent ensuite à une rechute (alors qu'ils n'auraient pas résisté à la maladie

(1) *Trypanosomes et trypanosomiasés*, 2^e édition, p. 154.

(2) *Trypanosomes et trypanosomiasés*, 2^e édition, p. 255.

évoluant naturellement); ces animaux ont acquis ce que nous appelons la prémunition. Ils concluent : « Ce serait évidemment l'idéal de produire de ces guérisons lentes, qui conduiraient à l'immunité. On en conçoit toute la difficulté. »

On citera, à titre d'exemple, la prémunition artificiellement conférée contre la trypanosomiase des dromadaires de l'Afrique du Nord, le debab. Au laboratoire, il est possible de prémunir sans risque des dromadaires contre le debab : on les inocule avec un virus d'infection latente, puis on « coupe » l'accès de première invasion par une médication appropriée, sans chercher à obtenir la stérilisation de l'organisme. Comme dans le traitement de toutes les trypanosomiasés, on donne alternativement des remèdes différents (émétique et atoxyl) afin de déjouer l'accoutumance du microbe aux médicaments. Ce procédé de prémunition pourrait être employé, sur le terrain, pour prémunir les meharas des Compagnies sahariennes, pendant leurs longues périodes de pâturage. Par cette prémunition systématique, on éviterait les pertes désastreuses en dromadaires qui ont marqué certaines expéditions : colonne du général Marey-Monge, lors de la première occupation du Sersou, prise des oasis du Touat et du Tidikelt.

TUBERCULOSE.

La prémunition dans la tuberculose a été définie, avant la lettre, par la « loi de Marfan », fondée en 1886 sur l'observation clinique : « On ne constate presque jamais de tuberculose pulmonaire, tout au moins de tuberculose pulmonaire évidente et en évolution, chez des sujets qui, pendant l'enfance, ont été atteints d'écrouelles (adénite tuberculeuse suppurée du cou) et qui en ont guéri complètement avant l'âge de quinze ans, cette guérison ayant eu lieu avant qu'aucun autre foyer de tuberculose eût été appréciable. » En somme, une tuberculose locale empêche très souvent le développement ultérieur d'une tuberculose généralisée. La présence de quelques unités microbiennes vivantes suffit même (infection sans maladie) à créer dans l'organisme un état réfractaire à la surinfection.

Les recherches de Calmette et Guérin ont apporté la confirmation expérimentale de la loi de Marfan. Des veaux soumis à

une seule infection, puis maintenus à l'abri de toute réinfection accidentelle, ne font habituellement que des lésions bénignes qui restent occultes; des veaux ainsi prémunis, en état d'infection latente, deviennent très résistants aux infections naturelles ou artificiellement provoquées, tandis que des bovidés neufs, réinfectés plusieurs fois, à des intervalles peu éloignés, prennent une tuberculose à forme évolutive grave, avec lésions pulmonaires étendues.

VACCINATION. — Pendant longtemps, la méconnaissance des conditions réelles de la résistance acquise à la tuberculose a fait tenter des milliers d'essais infructueux d'immunisation active par les procédés classiques employant des microbes morts : inoculation de bacilles tués par des moyens physiques (chauffage, radiations lumineuses), par divers réactifs chimiques, ou modifiés par des actions diastasiques, injection de lipoides ou d'autres substances extraites des corps bacillaires. D'autre part, de nombreux savants ont longuement et vainement procédé à des essais de sérothérapie.

Tous ces succès s'expliquent par le fait que la tuberculose n'est pas une maladie à immunité, mais qu'elle est une maladie à prémunition.

Eclairés par leurs recherches expérimentales sur la tuberculose bovine, dont ils ont rapproché les résultats des conclusions de la loi de Marfan, Calmette et Guérin ont résolu la question de la vaccination antituberculeuse par leur vaccin prémunissant BCG. Avant le BCG, divers virus-vaccins vivants avaient été expérimentés contre la tuberculose, mais aucun ne remplissait la condition formelle que doit présenter un virus atténué au sens de Pasteur : une souche de bacille de Koch n'est réellement et définitivement atténuée que lorsqu'elle est rendue inapte à produire, dans l'organisme des animaux les plus sensibles, des lésions tuberculeuses réinoculables. Calmette et Guérin, au contraire, sont arrivés à préparer un virus-vaccin définitivement atténué, le BCG. Ainsi qu'on sait, les recherches de ces auteurs ont eu pour point de départ, en 1908, l'utilisation de la bile pure de bœuf, mêlée aux cultures de bacilles tuberculeux pour en faciliter l'absorption lorsqu'on les administre par la bouche à des bovins. Calmette et Guérin constatent

que leur bacille tuberculeux, isolé d'un bovin, fort pathogène à l'origine, perd peu à peu de sa virulence pour les animaux d'expérience, en même temps que la constitution physico-chimique de l'enveloppe ciro-graisseuse du bacille se modifie. Après trente cultures successives en bile, l'atténuation de la virulence est déjà manifeste pour le jeune bovin. Après deux cent trente cultures, soit au bout de treize années, les réensemencements étant faits tous les vingt à vingt-cinq jours, le bacille est devenu incapable de provoquer, même aux fortes doses de 1 à 2 centigrammes chez le cobaye, des lésions tuberculeuses réinoculables. Les essais tentés depuis lors pour rendre à ce bacille, héréditairement atténué, sa virulence initiale ont échoué, non seulement dans le laboratoire de Calmette, mais entre les mains des expérimentateurs les plus qualifiés du monde entier.

D'une expérience qui porte, à l'heure actuelle, sur près de deux millions de sujets, on peut conclure avec Burnet que l'innocuité du BCG est démontrée et que la probabilité de son efficacité préventive croît de jour en jour. En outre, le BCG, inoffensif pour le sujet vacciné, l'est également pour la collectivité : les vaccinations ne risquent nullement de créer des réservoirs de virus, le BCG ayant perdu tout pouvoir pathogène.

ENTÉRITE PARATUBERCULEUSE DES BOVIDÉS.

Par sa nature et son évolution, cette maladie, due au bacille de Jones et de Frothinghan, rappelle la tuberculose.

Comme celle-ci, elle est justiciable de la prémunition. Le succès d'expériences de vaccination prémunitive en apporte la preuve. H. Vallée, Rinjard et M. Vallée ont prémuni plus de 35.000 bovins contre l'entérite paratuberculeuse, en inoculant un virus-vaccin constitué par la suspension de 5 à 10 milligrammes de cultures vivantes du microbe non modifié dans un excipient irrésorbable d'huile de vaseline et de grès porphyrisé. L'inoculation sous-cutanée de ce vaccin produit un abcès froid inextensible qui persiste fort longtemps, en ne créant qu'une lésion fibro-caséuse locale, sans tendance à la généralisation. Dans l'abcès, les bacilles de Jones conservent leur vitalité. Tant que cet abcès dure, les animaux sont réfractaires à toute surinfection. Dès que l'abcès guérit, ils redeviennent sensibles.

SYPHILIS.

« La syphilis ne se double pas » a dit Ricord. Pendant la période primaire, le sujet syphilitique reste sensible aux réinoculations expérimentales : on peut, presque toujours, donner un second chancre à un sujet porteur d'un accident primaire. Mais, dès l'apparition de la période secondaire — qui correspond à la généralisation du virus — la réceptivité disparaît ; les inoculations ne produisent que des effets négatifs — ou tout au moins abortifs. La date de l'apparition de cette résistance aux nouvelles contaminations est très variable, comme d'ailleurs la date de la généralisation du virus. On admet le délai de six semaines après la contamination ; c'est l'époque où apparaissent également les réactions sérologiques. Pendant la période tertiaire, on observe parfois de nouvelles infections. Mais, en fait, et dans les conditions naturelles, les surinfections authentiques sont exceptionnelles au cours d'une syphilis en évolution. En revanche, tout individu dont la syphilis est entièrement guérie redevient complètement sensible à une nouvelle contamination. La syphilis offre donc les caractères d'une maladie à prémunition.

La *syphilis du lapin* se comporte comme celle de l'homme, elle présente des périodes de latence du virus, coupées de rechutes ; les lapins infectés restent insensibles à de nouvelles inoculations tant que dure leur microbisme latent. Des lapins, dont les lésions guérissent sous l'action des arsenicaux, sont plus sensibles aux réinoculations que des témoins non traités.

VACCINATION. — Le fait que la syphilis est une maladie à prémunition et non pas à immunité explique encore que toutes les tentatives de préparation soit d'un sérum antisiphilitique efficace, soit d'un vaccin ne contenant pas de virus vivant aient échoué. C'est ce qu'ont montré, en particulier, les importantes recherches de Metchnikoff et Roux, celles de Neisser. Neisser a vu, dans ses expériences sur des milliers de singes et sur des lapins, pratiquées avec du virus vivant et virulent, que seuls les animaux réellement infectés acquéraient une résistance, et que cette résistance durait juste le temps de l'infection. Neisser

donnait à cet état réfractaire passager le nom d'« anergie », terme qui, dans ce sens, correspond exactement au terme de prémunition. Malheureusement, les essais d'obtention d'un virus-vaccin sûrement atténué (par des passages sur certaines espèces animales, par l'effet d'agents physiques ou chimiques) sont restés, jusqu'à présent, infructueux. La vaccination anti-syphilitique ne pourra être réalisée que par un virus-vaccin vivant, dont on aura obtenu l'atténuation certaine et définitive, et qui aura sûrement cessé d'être contagieux.

BRUCELLOSES.

La fièvre ondulante due à *Brucella melitensis* Bruce peut récidiver chez l'homme et chez la chèvre, mais la chèvre porteuse d'une infection chronique résiste aux surinfections.

D'autre part, il est connu depuis longtemps que la vache contaminée pour la première fois par *Brucella abortus* Bang, agent de l'avortement épizootique, avorte à son premier part, mais que, l'infection étant devenue chronique, les nouvelles contaminations n'ont pas d'effet; la vache n'avorte plus.

Le caractère de maladies à prémunition que présentent les brucelloses comporte des conséquences pratiques :

VACCINATION CONTRE LA FIÈVRE ONDULANTE. — Aucun vaccin préparé avec des *Brucella melitensis* tués ne procure un effet préventif démontré. Au contraire, E. A. Shaw a réussi à prémunir des singes contre la fièvre ondulante en leur inoculant des cultures vivantes de *Brucella melitensis*. Zammit et Debono ont récemment vacciné, avec succès, des chèvres contre la fièvre ondulante à *Brucella melitensis* par l'injection de cultures de la souche avirulente de *Brucella abortus* de A.-F. Huddleson. Le vaccin est constitué par une culture de trois jours, sur gélose, de ce *Brucella abortus*, mis en suspension dans 10 cent. cubes du filtrat d'une culture du même germe en bouillon de foie. C'est donc un virus-vaccin composé de microbes vivants.

VACCINATION CONTRE L'AVORTEMENT ÉPIZOOTIQUE DES VACHES. — Aucun vaccin tué n'a donné de résultats, au cours des très nombreux essais qui ont été tentés. Au contraire, un procédé

couramment entré dans la pratique dans les pays nordiques consiste à infecter les génisses avant la fécondation, avec des cultures vivantes de *Brucella abortus*. Les souches ne doivent être ni très virulentes : l'infection pourrait gagner la mamelle et rendre le lait dangereux pour le consommateur, ni d'une virulence trop faible : les vaches ne seraient pas prémunies ou seraient prémunies pour très peu de temps. D'ordinaire, la première gestation aboutit à un avortement, mais les produits ultérieurs arrivent à terme dans de bonnes conditions.

*
* *

En résumé, la distinction entre les maladies à immunité et les maladies à prémunition ne présente pas seulement un intérêt d'ordre théorique : elle offre un intérêt pratique immédiat pour la médecine préventive. Elle explique l'échec de certains essais de vaccination dans le passé. Elle délimite les domaines respectifs et définit les méthodes propres de la vaccination immunisante et de la vaccination prémunissante. Cette distinction nécessaire, et probablement féconde, résulte des caractères mêmes de l'immunité et de la prémunition, que l'on peut schématiser ainsi :

IMMUNITÉ. — *Après la guérison d'une maladie infectieuse aiguë, état réfractaire grâce auquel l'organisme résiste aux réinfections.*

1° L'immunité *suit* et, par définition, suppose la « désinfection » de l'organisme : elle est *post-infectieuse*.

2° L'immunité peut être conférée artificiellement au moyen de vaccins tués ou de toxines.

3° La sérothérapie des maladies à immunité peut être très efficace.

PRÉMUNITION. — *Au cours d'une maladie infectieuse chronique, tolérance réciproque de l'organisme et du microbe et résistance aux surinfections. Après la guérison, retour de la sensibilité aux réinfections.*

1° La prémunition *accompagne* et, par définition, suppose l'infection latente : elle est *co-infectieuse*.

2° La prémunition ne peut être conférée artificiellement que par des virus-vaccins *vivants*. L'infection latente d'emblée, obtenue avec des virus-vaccins atténués et fixes, incapables de créer des réservoirs de virus, représente l'idéal de la vaccination prémunissante.

3° La sérothérapie des maladies à prémunition est généralement inefficace.

DU ROLE DE LA PEAU DANS LA SARCOMATOSE DE LA SOURIS

par A. BESREDKA et L. GROSS.

C'est à Hanau (1889) que revient le mérite d'avoir le premier réalisé l'inoculation expérimentale du carcinome chez le rat et à Moreau (1891), jeune préparateur de la Faculté de Médecine de Paris, d'avoir transmis en série le cancer chez la souris. A l'époque, ces expériences avaient attiré à peine l'attention des savants, et ce n'est que plusieurs années plus tard que l'on vit paraître les recherches, bien connues des cancérologues, de Lœb, Jensen, Ehrlich et Apolant, Clowes, Borrel, Bridré, Michaelis, Bashford et ses collaborateurs, Murray, Haaland, Bowen, Woglom et de beaucoup d'autres. Les publications sur le cancer se multiplièrent depuis au point de nécessiter la création de périodiques spéciaux. Aujourd'hui, le problème est devenu d'une complexité très grande, d'autant plus que non seulement la nature des tumeurs, mais encore les conditions d'expériences et surtout la technique varient suivant les expérimentateurs; aussi ne manque-t-on pas de rencontrer des assertions quasi-contradictoires sous la plume des auteurs de compétence incontestable.

TECHNIQUE.

Comme nous l'avons indiqué précédemment, la technique que nous avons adoptée diffère de celle qui est communément en usage : au lieu d'insérer des fragments entiers de tumeur, nous opérons sur des émulsions de tumeur très fines. La tumeur, coupée d'abord aux ciseaux, est broyée ensuite dans un mortier en présence de quelques gouttes d'eau physiologique, jusqu'à ce qu'elle offre la consistance d'une bouillie capable de passer à travers l'aiguille du plus petit diamètre ($\frac{3}{10}$ de millimètre); avant d'être injectée, la bouillie sarcomateuse est tri-

turée sur un tamis en toile. En partant d'une tumeur de poids déterminé, nous pouvons doser plus ou moins exactement la quantité de virus sarcomateux que nous désirons injecter; nous nous comportons ensuite comme si nous étions en présence d'une émulsion de microbes pathogènes.

Suivant les besoins de l'expérience, les tumeurs sont émulsionnées dans 10 p. 100 à 20 p. 100 d'eau physiologique, puis injectées par différentes voies : sous la peau, dans la peau ou dans le péritoine.

INOCULATIONS SOUS-CUTANÉES.

Dans notre précédent mémoire, il a été déjà question de l'évolution de la tumeur sarcomateuse à la suite des injections sous-cutanées. Rappelons que dans les huit jours qui suivent, on voit apparaître une petite masse empâtée qui se transforme rapidement en une véritable tumeur aux contours précis. Cette tumeur atteint, au bout de quinze jours à trois semaines, les dimensions d'une noisette, puis d'une grosse noix. Cette tumeur, consécutive à l'inoculation sous-cutanée, est pratiquement mortelle dans 100 p. 100 des cas.

Tant que la tumeur n'est pas volumineuse, elle se laisse aisément écraser entre les doigts à travers la peau. On a l'impression que la tumeur a disparu, mais bientôt elle reparait — le lendemain ou le surlendemain — pour se développer avec plus de vigueur que les tumeurs témoins, laissées intactes.

Fait important sur lequel nous aurons à revenir, la tumeur sous-cutanée que l'on abandonne à son sort, c'est-à-dire dont on ne gêne pas le développement par une intervention extérieure, évolue sur place et ne s'accompagne qu'exceptionnellement de métastases.

INOCULATIONS INTRAPÉRITONÉALES.

Les inoculations intrapéritonéales sont très propices à l'évolution du sarcome. Il suffit quelquefois d'inoculer à la souris, dans le péritoine, une dose très faible pour obtenir la mort de l'animal en peu de temps. Nous recommandons cependant d'injecter une dose de 0 gr. 03 qui est celle que nous injectons sous la peau lorsque nous désirons obtenir une tumeur à coup

sûr. Dans la plupart des cas, huit ou dix jours après l'inoculation, on assiste à une péritonite sarcomateuse des plus caracté-



Fig. 1. — Tumeur intracutanée consécutive à l'inoculation intrapéritonéale.

risées. La cavité péritonéale renferme un liquide abondant (2 ou 3 cent. cubes), trouble, parfois sanguinolent, riche en lymphocytes et en gros mononucléaires. Le mésentère est

parsemé de très petites granulations sarcomateuses en nombre incalculable. Quelquefois, au contraire, on ne trouve, à l'autopsie, que deux ou trois grandes tumeurs au milieu d'un exsudat peu abondant.

Le liquide péritonéal se montre très virulent : nous avons pu reproduire une sarcomatose péritonéale typique, en injectant à des souris 1 cent. cube de liquide dilué à 1/10.000.

Ce liquide péritonéal est virulent aussi par voies intracutanée et sous-cutanée : la tumeur évolue rapidement en présentant les mêmes caractères que l'on observe lors de l'inoculation d'une dose massive de la tumeur elle-même.

Conservé à la glacière pendant neuf jours, ce liquide présente la même virulence qu'il possédait au moment de la ponction, alors que la tumeur émulsionnée dans l'eau physiologique perd déjà sa virulence après quarante-huit heures.

Un point sur lequel nous tenons à attirer l'attention et qui offre un intérêt en raison de l'analogie qui existe entre l'affection sarcomateuse et l'infection charbonneuse, est la réceptivité particulière de l'enveloppe cutanée à laquelle, dans le cas de sarcome, s'ajoute celle de la paroi péritonéale. Chez la plupart des souris inoculées dans le péritoine, nous avons observé une petite tumeur (fig. 1) juste au point de la pénétration de l'aiguille au niveau de la peau, et une autre tumeur pareille au point correspondant de la paroi péritonéale. La réceptivité de ces cellules doit être grande pour que la dose minime de virus (exsudat péritonéal dilué à 1/10.000) qui adhère à la pointe de l'aiguille de la seringue suffise pour donner naissance à une tumeur sarcomateuse. Nous n'avons rencontré une telle réceptivité cutanée que dans l'infection charbonneuse.

INOCULATIONS INTRACUTANÉES.

Les inoculations intracutanées de sarcome diffèrent des précédentes en ce que leur effet varie suivant la dose employée. Dans les cas d'injections sous-cutanées ou intrapéritonéales, ou la tumeur ne se développe pas et l'animal reste normal, ou bien la tumeur se développe et en ce cas l'animal est voué à une mort certaine.

Or, chez les animaux inoculés dans la peau, plusieurs cas

peuvent se présenter. Si la dose injectée est forte, la tumeur intracutanée augmente progressivement jusqu'à la mort; elle présente en ce cas certaines particularités relatives à sa propagation, que l'on n'observe pas dans les tumeurs sous-cutanées; nous allons y revenir. Si la dose est trop faible, la souris ne réagit pas et se comporte ultérieurement comme un animal neuf. Mais, si la dose n'est ni trop faible, ni trop forte, on assiste à l'apparition d'une tumeur intracutanée qui se développe pendant quelque temps, deux semaines environ; puis, rapidement, elle se met à régresser pour disparaître complètement en laissant l'animal en parfait état de santé.

Si le premier cas offre un intérêt au point de vue du mode de développement du néoplasme et des moyens de défense que lui oppose l'organisme, le troisième cas est surtout intéressant au point de vue du mécanisme de l'immunisation.

a) INJECTION DE DOSES MASSIVES. — Injectons à une souris, dans la peau, une dose massive de sarcome : 0 c. c. 2 d'une émulsion à 20 ou 25 p. 100. Dans les six à huit jours qui suivent, nous verrons apparaître au niveau de l'inoculation une tumeur intracutanée. Celle-ci, enclavée dans la peau, suit d'abord les mouvements de cette dernière et se présente, au début, sous forme d'une verrue demi-sphérique, rose, rénitente, susceptible d'atteindre le volume d'un gros pois (1). Bientôt, on la voit s'aplatir et se recouvrir d'une croûte grisâtre. Elle continue néanmoins à augmenter de volume; ses bords s'épaississent, s'arrondissent, s'élèvent et encerclent la croûte qui occupe maintenant le centre creux de la tumeur. Celle-ci cesse d'être mobilisable : au lieu d'être seulement intracutanée, elle intéresse tous les tissus sous-jacents.

Arrivée à ce stade de développement, la tumeur est encore susceptible de subir, à sa partie centrale, une régression, partielle il est vrai, mais assez importante. Mais, elle ne tarde pas à reprendre de l'activité, notamment à la périphérie où son développement se poursuit assez activement. A un moment donné, on a l'impression que l'organisme, qui jusque-là se défendait, avec plus ou moins de succès, contre l'envahissement

(1) Dans les cas où l'émulsion injectée dépasse 30 à 40 p. 100, la tumeur intracutanée évolue rapidement, tout comme une tumeur sous-cutanée.

de la tumeur, abandonne la lutte : la tumeur augmente, la peau s'ulcère, et l'animal succombe au bout de quelques semaines à une infection intercurrente.

Dans les cas où l'infection secondaire ne se produit pas, on assiste à l'apparition de métastases, d'abord au niveau de deux pattes les plus proches, et bientôt au niveau de quatre extrémités. Ces métastases évoluent rapidement et en quelques jours emportent l'animal. En plus de ces métastases qui atteignent les dimensions d'une noix, on peut trouver, à l'autopsie, d'autres métastases au niveau des reins et parfois au niveau des capsules surrénales. Ces métastases sont parfois plus volumineuses que la tumeur cutanée primaire elle-même.

b) MÉTASTASES SANS TUMEUR PRIMAIRE. — Il arrive que la tumeur cutanée, après avoir donné naissance à des métastases, régresse complètement : aussi l'expérimentateur, qui n'aurait pas suivi le processus de près, se trouve-t-il un jour en présence d'un animal qui, tout en étant porteur d'une ou de plusieurs tumeurs métastatiques, ne présente point trace de la tumeur initiale (fig. 2). Voici l'histoire d'un tel animal :

Le 28 février, on fait à une souris une injection intracutanée. Le 6 mars, on est en présence d'une tumeur intracutanée ayant les dimensions d'un grain de café. Le 19 mars, la tumeur s'aplatit et, le 21 mars, elle se recouvre d'une croûte. Le 28 mars, la tumeur ayant regressé, on ne voit que la croûte et en même temps une métastase au niveau de la patte antérieure gauche. Les jours suivants, la métastase croît rapidement, cependant que la croûte, qui siégeait au niveau de l'inoculation cutanée avait déjà disparu. Le 6 avril, la souris ne présente qu'une cicatrice cutanée souple, à peine appréciable, pouvant facilement passer inaperçue, alors que, seule, persiste dans la région axillaire une grosse métastase (fig. 2) ayant, comme l'a montré l'examen microscopique, la même structure que la tumeur initiale.

Comme nous l'avons indiqué plus haut, c'est la présence des métastases, qui distingue, dans la majorité des cas, l'évolution des tumeurs intracutanées de celle des tumeurs sous-cutanées. En observant les unes et les autres, on ne peut guère s'empêcher d'une comparaison qui, tout en étant schématique, n'en traduit

pas moins leurs caractères respectifs. Volontiers on ferait un rapprochement entre le sarcome sous-cutané et une tumeur



FIG. 2. — Métastase après la disparition de la tumeur initiale.

blanche se développant d'une façon insidieuse, sans intéresser, dans les débuts, au moins, les tissus avoisinants. Par contre, le

sarcome intracutané nous fait penser à une tumeur inflammatoire, caractérisée par une participation active de la peau et de son système vasculaire.

c) INJECTION DE DOSES FAIBLES : ÉVOLUTION ET DISPARITION DES TUMEURS INTRACUTANÉES. — C'est grâce au caractère « inflamma-



FIG. 3. — Tumeur intracutanée en pleine évolution.

toire », propre au sarcome intracutané, que l'inoculation d'une dose faible de virus dans la peau imprime à son évolution un cachet spécial. En effet, la petite bulle, qui se forme dès qu'on introduit dans l'épaisseur de la peau une goutte ($2/100$ à $3/100$ de centimètre cube d'une émulsion à 20 p. 100, s'efface vite et, ce n'est que cinq à sept jours plus tard, que l'on aperçoit, à la place même de la piqûre, une petite excroissance ou

une sorte de verrue. Les jours suivants, cette dernière se présente sous l'aspect d'un nodule rose, pouvant atteindre le volume d'un pois ou d'un grain de café (fig. 3). Vers le quinzième jour, la tumeur intracutanée, dont la nature sarcomateuse est attestée à la fois par le microscope et les inoculations, s'affaisse; la mince pellicule cutanée qui la recouvre s'ulcère.



FIG. 4. — Involution de la tumeur intracutanée et formation de la croûte.

Une croûte se forme (fig. 4). Celle-ci s'étend en largeur, s'épaissit, cependant que la tumeur elle-même s'aplatit chaque jour davantage. Finalement, la croûte se détache, en laissant derrière elle une cicatrice qui est souvent à peine visible (fig. 5). La survie de l'animal est dès lors assurée.

L'évolution bénigne de cette tumeur intracutanée (fig. 7) aurait pu faire naître des doutes sur sa nature. Or, pour peu que l'on procède à son excision avant qu'elle régresse, il est facile de s'assurer que sa structure est celle de la tumeur

d'origine (fig. 6). Elle en partage également la virulence; ainsi, il suffit d'inoculer la petite tumeur intracutanée sous la peau d'une souris neuve, pour voir apparaître, au bout d'un délai normal, une tumeur sarcomateuse sous-cutanée, aboutissant à la mort de l'animal.



FIG. 5. — Chûte de la croûte, suivie de cicatrisation.

On peut obtenir le même résultat en excisant la tumeur intracutanée et en l'insérant séance tenante sous la peau de la même souris. Dans la huitaine qui suit cette opération, on constate que la tumeur, devenue sous-cutanée, se met à croître et acquiert les caractères propres à ce genre de tumeurs.

Parfois, il suffit d'écraser fortement la tumeur intracutanée entre les doigts, pour rompre la barrière qui sépare le derme du tissu sous-cutané : le virus sarcomateux s'infiltré sous la

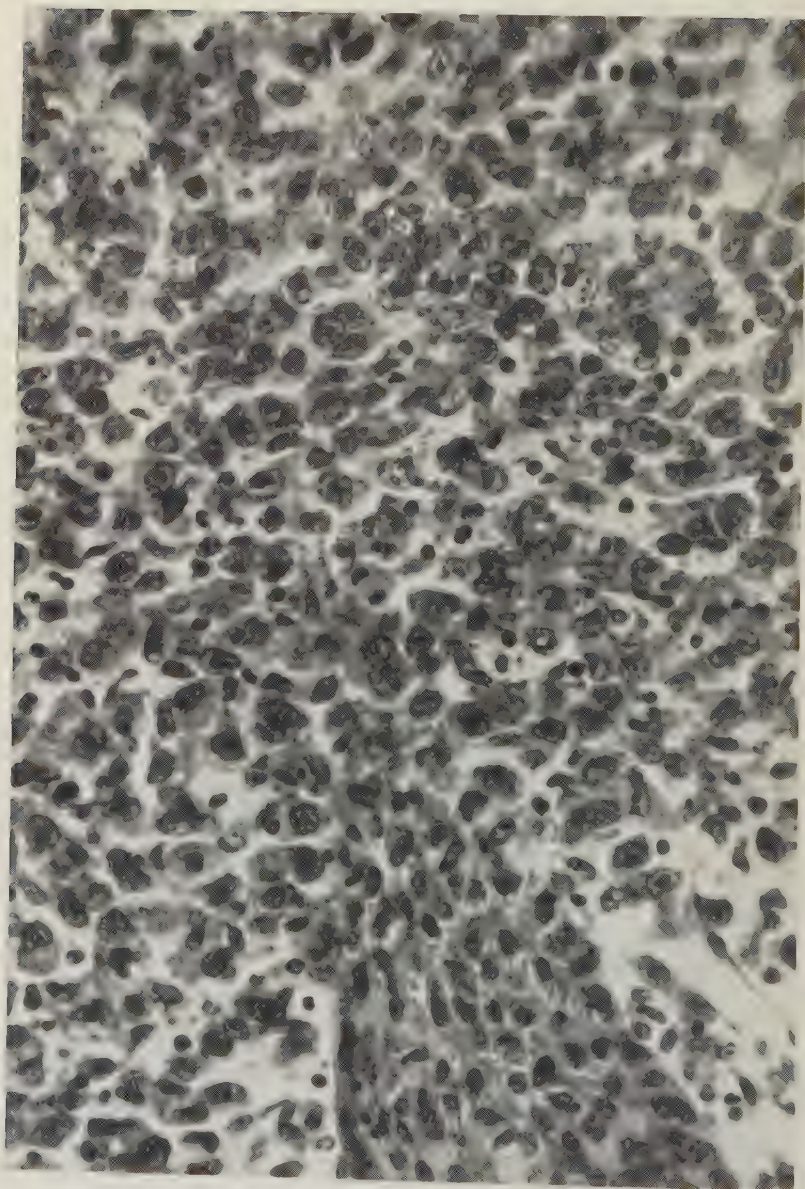


FIG. 6. — Coupe de la tumeur intracutanée en pleine évolution (gross. : 600). •



FIG. 7. — Coupe de la tumeur intracutanée en pleine évolution (gross. : 40).

peau et y donne naissance à une tumeur qui entraîne la mort de l'animal.

Voici, pour fixer les idées les détails de quelques expériences.

EXPÉRIENCE 1. — 8 souris sont inoculées dans la peau. Une semaine plus tard, on procède à l'excision des tumeurs intracutanées. Sur les 8 souris opérées, 5 survivent. Chez les trois autres, trois semaines après l'opération, on constate, au niveau des pattes antérieures, des métastases avec issue fatale en peu de temps. Notons qu'aucune des 8 souris opérées ne présente de récurrence locale, ce qui indique que l'ablation de la tumeur a été totale.

EXPÉRIENCE 2. — Une souris ayant reçu dans la peau une petite dose (0 c. c. 1), d'une émulsion diluée au dixième, est opérée dix jours après. La tumeur intracutanée, après avoir été excisée, est introduite chez la même souris sous la peau. Une semaine plus tard, on constate une tumeur sous-cutanée, grosse comme une noix. La souris meurt peu de temps après. La petite tumeur intracutanée, abandonnée à son propre sort, aurait, très vraisemblablement, régressé en laissant l'animal en vie.

Nous avons pu nous rendre compte que tout traumatisme, même léger, est capable de provoquer des métastases et cela parfois dans les quarante-huit heures qui suivent.

Les souris, porteuses des tumeurs sous-cutanées, chez lesquelles les métastases, comme nous l'avons déjà indiqué, sont extrêmement rares, montrent presque toujours des métastases dans un délai très court après avoir subi une opération, même radicale. En voici un exemple :

Le 23 mars, 4 souris sont injectées sous la peau. Le 5 avril, on procède à une opération radicale. Dans les deux semaines qui suivent, les quatre souris présentent des métastases. Laissées à leur propre sort, ces souris n'auraient pas eu, très probablement, de métastases.

Nous avons eu nettement l'impression au cours de ces expériences que tout traumatisme ou opération chirurgicale — biopsie ou ablation radicale de la tumeur — contribue à essaimer le virus et à précipiter le dénouement fatal.

Par contre, pour peu que l'on respecte l'intégrité de l'appareil cutané et le pouvoir défensif qui lui est propre, on a des chances de voir évoluer la tumeur intracutanée vers la guérison, à la condition toutefois que l'injection soit faite strictement dans la peau et que la dose inoculée ne soit pas massive.

Il est utile cependant d'être prévenu que, malgré les précautions que l'on prend pour introduire le virus uniquement dans la

peau, il arrive parfois, en raison de la finesse de la peau de la souris, qu'une partie minime d'émulsion sarcomateuse passe sous la peau et donne naissance à une tumeur qui ne se résorbe pas.

CONCLUSIONS.

Les inoculations de sarcome sous la peau donnent naissance à des tumeurs qui évoluent progressivement jusqu'à la mort, sans être suivies de métastases dans la grande majorité des cas. Les inoculations de sarcome dans le péritoine produisent une péritonite mortelle; au niveau de la pénétration de l'aiguille dans le péritoine, on constate souvent une tumeur cutanée à laquelle fait suite une tumeur de même nature dans la paroi péritonéale.

Le liquide prélevé dans le péritoine est très virulent par toutes les voies et surtout en injection intrapéritonéale. *In vitro*, ce liquide conserve sa virulence plus longtemps que l'émulsion de la tumeur.

Les inoculations de sarcome dans la peau, en cas de doses massives, donnent naissance à des tumeurs suivies de métastases rapidement mortelles, chez la plupart des animaux; ces tumeurs intracutanées peuvent disparaître, tandis que, seules, les métastases persistent.

Les inoculations de doses faibles de sarcome dans la peau donnent naissance à des tumeurs qui, après avoir atteint le volume d'un grain de café, se résorbent dans la suite et laissent les souris en vie.

BIBLIOGRAPHIE

- [1] HANAU (A.). *Fortschr. der Medizin*, 7, 1889, p. 321.
- [2] MOREAU (H.). *C. R. Soc. Biol.*, 1891, p. 289 et 721.
- [3] LOEB (L.). *Virch. Arch.*, 167, 1902, p. 175; *Zeitschr. f. Krebsf.*, 5, 1907, p. 451.
- [4] JENSEN. *Zentralbl. f. Bakter.*, 34, 1903, p. 28 et 122.
- [5] EHRLICH (P.) et APOLANT. *Zeitschr. f. Krebsf.*, 5, 1907, p. 59; *Berl. klin. Woch.*, 1905, p. 871; *Ibid.*, 1906, p. 668.
- [6] EHRLICH (P.), APOLANT et HAALAND. *Berl. klin. Woch.*, 1906, p. 871.
- [7] CLOWES (G.). *Brit. med. Journ.*, 1906, p. 1548.
- [8] BORREL (C.). *Ces Annales*, 1907, p. 760; *Bull. Inst. Pasteur*, 1907.
- [9] BRIDRÉ, *Ces Annales*, 1907, p. 760.
- [10] MICHAELIS. *Zeitschr. f. Krebsf.*, 4, 1906, p. 1; 5, 1907, p. 189 et 191.

- [41] BASHFORD (E.). *Investig. Cancer Research Fund, Brit. med. Journ.*, 1906, p. 1554.
- [42] BASHFORD (E.), MURRAY et HAALAND. *Berl. klin. Woch.*, 1907, p. 1194.
- [43] BASHFORD (E.), MURRAY et BOWEN. *Zeitschr. f. Krebsf.*, 5, 1907, p. 417.
- [44] BASHFORD (E.) et WOGLOM, d'après APOLANT. *Zeitschr. f. Krebsf.*, 11, 1912, p. 97.
- [45] APOLANT (H.). *Zeitschr. f. Krebsf.*, 11, 1912, p. 97.
- [16] BESREDKA (A.), *Ces Annales*, 35, 1921, p. 421.
- [17] BESREDKA (A.) et GROSS (L.), *Ces Annales*, 53, 1934, p. 341.
- [18] BESREDKA (A.) et GROSS (L.). *C. R. Académie Sciences*, 200, 1935, p. 175 et 790.

ACTION DE CERTAINS SELS SUR LA RÉACTION DE BORDET-WASSERMANN

par R. DUJARRIC DE LA RIVIÈRE, N. KOSSOVITCH
et HOANG TICH TRY.

Au cours de nos recherches sur l'adsorption de diverses substances par les globules rouges [6, 7, 8] nous avons eu l'occasion de constater l'action que certains sels exercent sur eux. Ces constatations nous ont conduits à étudier comparativement l'effet de ces sels sur les sérums que l'on met en réaction avec les globules. Les modifications que peut apporter aux résultats de la réaction de Bordet-Wassermann le traitement préalable des globules ou des sérums par les sels de mercure, d'arsenic ou de bismuth nous ont paru assez intéressantes pour justifier quelques expériences dont nous donnons ici les résultats.

Grenit Douin [13] avait constaté depuis longtemps que, lorsqu'on met les sulfates de terres rares en contact, dans certaines conditions de dose, de température et de temps avec un sérum syphilitique, la réaction de Bordet-Wassermann, de positive devient négative.

G. d'Allessandro et L. Gaglio [4], ayant mis une solution d'acide chlorhydrique au 1/50 N en contact avec un sérum syphilitique à l'étuve à 37° pendant une heure, constatèrent que la réaction de Bordet-Wassermann devenait négative bien qu'ils eussent pris soin de neutraliser la quantité d'acide en excès par une solution de soude au 1/10 N.

A. Siegler et E. Soru [21] ont montré que le sérum humain normal, soumis à l'action, plus ou moins prolongée, d'une petite quantité de certains métaux : fer, nickel, cobalt, manganèse, donne une réaction de Bauer-Hecht positive.

Casoni [3] s'est demandé si certains médicaments courants : fer, arsenic, strychnine, gaiacol, glycérophosphate de chaux, quinine, administrés à des syphilitiques, n'ont pas une action sur l'épreuve de Bordet-Wassermann. Il constata chez deux malades, soumis aux injections d'arséniate de soude ou de

quinine, une négativation de la réaction. Mais cette réaction négative ne persista pas longtemps et l'auteur montra qu'elle n'était pas liée à la présence dans le sérum de quantités décelables d'arsenic ou de quinine.

Dolri et Bruck [4] mélangèrent des sérums normaux ou syphilitiques à des solutions mercurielles, iodurées ou arsenicales et pratiquèrent ensuite la réaction de fixation. Ils observèrent que ces agents médicamenteux n'ont *in vitro* aucune action pour transformer la réaction de Bordet-Wassermann dans un sens ou dans un autre.

Joltrain [15], en ajoutant *in vitro* du mercure colloïdal isotonique aux sérums dont il cherchait la teneur en anticorps, ne trouva jamais de modifications dans les résultats de la réaction de Bordet-Wassermann. Il n'eut pas plus de succès avec l'arsenic colloïdal.

Epstein et Pribram [9] empêchèrent la réaction de fixation de se produire en ajoutant 0 gr. 05 de bichlorure de mercure à un sérum fixant.

Kiralyfi [16] puis Satta et Donati [20] arrivèrent aux mêmes conclusions.

Bruck, refaisant de nouveaux contrôles, confirma que l'addition de certaines dilutions de 1/1.000 à 1/20.000 de sels de mercure rend négative la réaction d'un sérum fixant. Mais, d'après lui, il s'agirait d'un pouvoir hémolysant de la solution médicamenteuse. Il conclut de ses recherches que la réaction de Bordet-Wassermann s'est bien produite mais qu'elle n'est pas mise en évidence, l'indication hémolytique étant faussée.

Les travaux poursuivis sur cette question ont donc donné des résultats contradictoires. D'une façon générale, la plupart des auteurs inclinent à penser qu'il y a des modifications dans la réaction de fixation lorsqu'on ajoute au sérum syphilitique des dilutions de sels mercuriels ou arsénicaux. Ce qui les gênait dans leurs expériences c'est l'existence de deux facteurs qui peuvent fausser l'indication hémolytique de la réaction de Bordet-Wassermann : le pouvoir hémolytique de la plupart des sels de mercure et le pouvoir fixateur des sels d'arsenic employés en solution très alcaline.

Les travaux que deux d'entre nous ont poursuivis sur cette question [6] ont permis de surmonter les difficultés dont nous

venons de parler. Ces recherches ont montré que les globules rouges d'homme et d'animaux, mis en contact *in vitro* avec des solutions de certains sels de mercure, d'arsenic ou de bismuth, subissent, suivant le taux de la dilution, des modifications que nous allons exposer.

ÉTUDE DU POUVOIR HÉMOLYTIQUE DES SELS DE MERCURE, D'ARSENIC ET DE BISMUTH.

Le rôle joué par les globules rouges vis-à-vis de certains sels, ou produits chimiquement définis, a fait dans ces dernières années l'objet de quelques études intéressantes.

En 1928, Barron et Harrop [2] montrèrent que le bleu de méthylène, qu'ils employaient en solution de 0,005 à 0,0005 p. 100, produit, dans les globules rouges non nucléés, une augmentation considérable de la consommation d'oxygène, en même temps qu'une disparition de glucose. Wendel [24], Warburg, Kudowitz et Christian [23] établirent qu'il se produit dans ces conditions de l'acide pyruvique.

Marriott [18], Engfeldt [8] Snapper et Grunbaum [22] avaient établi que le sang est capable de transformer l'acide diacétique en acétone, que cette transformation peut porter sur des quantités abondantes chez le diabétique, et qu'elle serait due à l'action des protéines des globules et du plasma (Engfeldt). Dans un très remarquable article, P.-E. Grégoire [12] a montré que la disparition de l'acide diacétique, en présence de plasma et surtout de globules rouges, est un phénomène net et constant. En additionnant le pouvoir de destruction des globules rouges et celui du plasma, on constate que 50 cent. cubes de sang sont capables de décomposer 10 à 12 milligrammes d'acide diacétique en une heure, ce qui correspond, pour les 5 litres de sang d'un homme adulte de 70 kilogrammes, à 1 gr. 25 par heure, soit 30 grammes par jour. L'acétone formée correspond à la quantité d'acide diacétique disparu.

L'action des sels de mercure, d'arsenic et de bismuth a été étudiée par nous dans les conditions suivantes :

Le sang est défibriné et les globules sont lavés soigneusement (à 4 ou 5 reprises). Des dilutions progressivement crois-

SEL	CYAN. Hg						BI-IOD. Hg				
	1 100	1 500	1 1.000	1 5.000	1 10.000	1 20.000	1 100	1 500	1 1.000	1 5.000	1 10.000
Dilutions											
Globules de :											Résu
Homme	O	O	O	O	O	O	O	O	O	O	O
Chimpanzé	O	O	O	O	O	O	±	O	O	O	O
Papion	O	O	O	O	O	O	O	O	O	O	O
Patas	O	O	O	O	O	O	O	O	O	O	O
Cheval	+	O	O	O	O	O	+	O	O	O	O
Mouton	+	±	O	O	O	O	+	±	O	O	O
Lapin	O	O	O	O	O	O	+	+	±	O	O
Cobaye	O	O	O	O	O	O	±	O	O	O	O
Pigeon	O	O	O	O	O	O	±	±	±	O	O
Résultat après 1 h											
Homme	+	+	+	±	O	O	g	g	g	O	O
Chimpanzé	f	±	±	±	±	±	±	±	±	±	±
Papion	+	O	O	O	O	O	P	O	O	O	O
Patas	+	O	O	O	O	O	±	P	O	O	O
Cheval	+	+	+	O	O	O	+	O	O	+	+
Mouton	+	+	+	O	O	O	+	+	+	+	O
Lapin	+	O	O	O	O	O	+	+	+	±	O
Cobaye	O	O	O	O	O	O	P	P	P	P	P
Pigeon	+	O	O	O	O	O	+	+	+	O	O
Résultat après 24 he											
Homme	+	+	+	+	+	+	g	g	g	g	g
Chimpanzé	f	±	±	±	±	±	g	g	g	g	g
Papion	+	+	+	+	+	±	g	g	g	g	g
Patas	+	+	+	+	+	+	±	±	P	±	±
Cheval	+	+	+	+	±	O	+	+	+	+	+
Mouton	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Lapin	+	+	+	+	+	±	g	g	g	+	+
Cobaye	+	+	+	+	±	O	P	P	P	g	g
Pigeon	+	±	±	O	O	O	+	+	+	O	O

+, hémolyse; ±, hémolyse partielle; O, pas d'hémolyse; f, floculation à grains fins; g, gélification.

santes de sels (de 1/10 à 1/20.000) sont mises au contact de ces globules. Le mélange est fait à parties égales :

Solution saline à n p. 100, en centimètre cube. 0,5

Globules à 5 p. 100, en centimètre cube 0,5

Les résultats sont lus : immédiatement, puis après un séjour d'une heure à l'étuve à 37° et enfin après vingt-quatre heures,

BENZ. Hg.				ARSÉNOBENZOL				BISMUTH SOLUBLE A				BISMUTH SOLUBLE B			
1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	
1.000	5.000	10.000	20.000	100	500	1.000	5.000	10.000	20.000	100	500	1.000	5.000	10.000	20.000

l'on peut retourner le tube sans qu'il s'écoule la moindre trace de liquide.

Le tableau I indique les résultats que l'on obtient lorsqu'on met des globules de différentes espèces animales au contact de sels de mercure, d'arsenic et de bismuth (A et B sont ici deux préparations différentes de bismuth). Pour ne pas alourdir ce tableau déjà très étendu, nous avons supprimé quelques taux intermédiaires de dilution, utiles pour la marche de l'expérience, mais qui n'étaient pas indispensables pour la lecture des résultats. On voit qu'aux doses de sels utilisées il ne se produit aucun phénomène immédiat lorsqu'on emploie des globules rouges d'homme. Les globules de chimpanzé, de cheval, de mouton, de lapin, de cobaye sont déjà plus ou moins hémolysés; ceux des singes, en présence de certains sels de bismuth, donnent lieu à une floculation suivie de précipitation. Après une heure d'étuve à 37°, le cyanure de mercure a hémolysé plus ou moins complètement les globules de presque tous les animaux en expérience et le bi-iodure de mercure, au contact des globules d'homme, a entraîné la gélification du milieu. Au bout de vingt-quatre heures de séjour à la température du laboratoire, on peut noter des phénomènes intéressants et très nets : le cyanure de mercure a un pouvoir hémolytique marqué, s'exerçant sur les globules de toutes les espèces et jusqu'à des taux de dilution très élevés; le bi-iodure donne une gélification complète avec le sang de l'homme et de certains singes (1); l'arsénobenzol ne produit d'hémolyse dans aucun cas; les sels de bismuth n'hémolysent pas les globules d'homme, mais hémolysent ceux de plusieurs des animaux en expérience.

Pour compléter ces premières recherches, nous avons étudié ce que devient la résistance globulaire lorsque les globules ont été préalablement mis au contact des solutions médicamenteuses dont nous venons de parler. La méthode employée, pour cette recherche, a été celle, bien connue, de Widal et Abrami (mais avec une solution à 8 au lieu de 9 p. 100, ce qui donne des chiffres un peu moins élevés).

Nous avons d'abord déterminé la résistance des globules des

(1) Depuis nos premières recherches, M. Kopaszewsky a observé ce phénomène de gélification en ajoutant de l'acide lactique aux sérums de cancéreux.

différentes espèces en expérience avant toute addition de médicament et nous avons obtenu les valeurs suivantes (moyenne de plusieurs sangs pour chaque cas) :

Homme.	3	p. 1.000
Chimpanzé	2	—
Cheval	3,5	—
Mouton.	3,5	—

Il est important de noter ici que nous avons obtenu le même chiffre pour les globules rouges d'homme syphilitique que pour ceux de l'homme normal.

Nous avons ensuite mesuré la résistance des globules après contact avec les solutions médicamenteuses. Le tableau II indique les résultats obtenus.

On voit que, mis en présence des sels de mercure, d'arsenic ou de bismuth, les globules de sang syphilitique prennent une résistance notablement supérieure à celle des globules de sang normal traité dans les mêmes conditions.

TABLEAU II.

MÉDICAMENT	DILUTION	GLOBULES				
		Homme p. 1.000		Chimpanzé	Cheval	Mouton
		Σ	N	p. 1.000	p. 1.000	p. 1.000
Cya. Hg.	1/20.000	3,5	3	2,5	5,5	3,5
Bi-iod. Hg.	1/20.000	1,5	1,5	1,5	3,5	4
Benz. Hg.	1/10.000	5	4	4	5	4
Bismuth.	1/10.000	3	2	3,5	5,5	3,5
Arsénobenzol	1/ 3.000	3	2			
Σ, sang de syphilitique; N, sang normal.						

On constate aussi que le contact avec les sels de mercure et de bismuth a augmenté la résistance des globules de certains animaux : chimpanzé, cheval, mouton.

En présence de ces modifications de la résistance globulaire, il devenait intéressant de savoir ce que donneraient pour la réaction de Bordet-Wassermann des globules préalablement

soumis à l'action des solutions médicamenteuses dont nous avons déjà parlé. L'expérience a été conduite de la façon suivante : on cherche d'abord la limite du pouvoir hémolytique du sel (si les expériences précédentes ont montré que le sel est hémolytique) et on choisit une dose notablement plus élevée que la dose minima hémolytique.

De toutes façons et quel que soit le médicament employé, on vérifie d'abord soigneusement qu'il n'est pas hémolytique aux doses employées. La dilution choisie est ensuite mise à l'étuve à 37° au contact des globules à l'étude dans les proportions suivantes :

Dilution non hémolytique du sel, en centimètre cube. . . .	0,5
Emulsion globulaire, en centimètre cube	0,5

Dans une série d'expériences, les globules seront lavés après ce contact ; dans l'autre, ils seront employés directement. Dans tous les cas, au moment de l'emploi, on ajoute 9 cent. cubes d'eau physiologique de façon à obtenir une émulsion à 5 p. 100 de globules qui est ordinairement utilisée par la réaction de Bordet-Wassermann.

TABLEAU III.

	SÉRUMS positifs	SÉRUMS négatifs
<i>Globules ayant adsorbé différents sels et non soumis au lavage avant la réaction de Wasserman.</i>		
Cya. Hg 1/20.000.	O	H
Bi-iod. Hg 1/20.000.	O	H
Benz. Hg 1/1.000.	±	H
Benz. Hg 1/500.	+	H
<i>Globules ayant adsorbé différents sels et soumis au lavage avant la réaction.</i>		
Cya. Hg 1/20.000.	O	H
Bi-iod. Hg 1/20.000.	O	H
Benz. Hg 1/1.000.	±	H
Benz. Hg 1/500	±; totale après 24 h.	H

O, Pas d'hémolyse ; +, Hémolyse ; ±, hémolyse partielle.

Les sérums sont préalablement étalonnés en pratiquant — avec des globules normaux — la réaction de Bordet-Wassermann et celle de Levaditi. On choisit ceux qui sont nettement positifs ou négatifs. Avec ces sérums et les globules, préparés

comme nous venons de l'indiquer, on fait une nouvelle réaction de Bordet-Wassermann. Le tableau III donne la moyenne des résultats obtenus avec un certain nombre de sérums positifs et négatifs. On constate que les sérums positifs deviennent négatifs lorsque les globules ont été préalablement soumis à l'action de certains médicaments (en particulier du benzoate de mercure). Il est à noter que le résultat est plus net, l'hémolyse plus complète quand les globules n'ont pas été lavés après le contact avec la solution de médicament.

RÉACTION DE BORDET-WASSERMANN AVEC LES SÉRUMS PRÉALABLEMENT TRAITÉS.

L'augmentation de la résistance des globules de certains animaux après leur contact avec les sels de mercure, de bismuth et d'arsenic, les modifications de la réaction de Bordet-Wassermann pratiquée sur des sérums normaux et syphilitiques avec ces globules préalablement traités, nous ont engagés à rechercher si des modifications du même ordre, ne se produiraient pas quand on emploie des globules *normaux* et des sérums préalablement soumis à l'action des sels. Nous avons été ainsi amenés à pratiquer une nouvelle série de recherches.

Les expériences que nous avons exposées dans le chapitre précédent nous ont permis de déterminer la limite du pouvoir hémolytique de chaque sel. Cette détermination préalable était indispensable, car le taux des dilutions de sels médicamenteux que l'on met en contact avec les sérums devra être supérieur à la limite d'hémolyse, faute de quoi l'indication hémolytique de la réaction de Bordet-Wassermann serait faussée.

Dans nos premières recherches, nous avons employé des dilutions de :

Pour le cyanure et le bi-iodure de mercure.	1/20.000
Pour le benzoate de mercure.	1/10.000
Pour le bismuth	1/10.000
Pour l'arsénobenzol	1/ 3.000

Ces dilutions sont déjà élevées et dépassent de beaucoup la limite de l'hémolyse. Si nous calculons maintenant quel devrait être le taux de dilution du cyanure de mercure, par exemple,

dans le sang d'un sujet possédant 5 litres de sang et ayant subi une série de dix injections de cyanure de mercure contenant chacune 0 centigr. 01 de sel, nous verrons que ce taux :

$$\frac{0 \text{ gr. } 10}{5 \text{ litres}} = \frac{1}{50.000}$$

est bien supérieur au taux précédent. Il en est de même pour les autres sels.

Dans une deuxième série d'expériences, nous nous sommes basés pour faire nos dilutions sur la quantité de sels administrés après une série d'injections ; il sera ainsi possible de comparer les modifications de la réaction de Wassermann pratiquée d'une part avec un sérum expérimentalement traité par les différents sels dont nous venons de parler et, d'autre part, avec le sérum d'un malade traité par l'un quelconque de ces sels.

Ainsi, pour le cyanure de mercure, nous faisons une dilution totale de 1/50.000 correspondant à la teneur en sel de mercure qu'aurait le sang d'un malade ayant subi une série de dix injections de cyanure de mercure à raison de 0 gr. 01 de sel par injection. Nous avons procédé de même pour les autres sels et voici les taux que nous avons employés :

Cyanure, bi-iodure et benzoate de mercure	1/50.000
Arsénobenzol.	1/ 3.000
Bismuth C.	1/10.000
Bismuth C.	1/25.000

Un échantillon de chacun des sérums (positifs et négatifs) est mis en contact avec divers sels. Nous prenons une quantité égale de sérum et de dilution médicamenteuse de manière à avoir un taux de dilution totale égal au double du taux de la solution médicamenteuse ; nous prenons, par exemple :

Cyanure de mercure dilué au 1/25.000, en centimètre cube .	0,2
Sérum chauffé, en centimètre cube	0,2

pour avoir la dilution totale de 1/50.000 que nous voulons expérimenter. Nous brassons bien le mélange, puis nous le mettons à l'étuve à 37° pendant une heure.

Nous pratiquons ensuite avec les sérums, ainsi préparés, une réaction de Bordet-Wassermann type. Voici le dispositif adopté :

NUMÉRO DES TUBES.	1	2	3	4	5	6	7
Antigène dilué au 1/20.	0,1	0,2	»	0,1	0,2	»	»
Alexine diluée (suivant titrage) . . .	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	»
Sérum traité	0,4	0,4	0,4	»	»	»	»
Eau physiologique à 8,5 p. 1.000. . .	1,6	1,5	1,7	2,9	1,9	2,1	2,2
Etuve à 37°, pendant une heure.							
Globules rouges sensibilisés.	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5
Etuve à 37° pendant une demi-heure.							

Dans une première série d'expériences poursuivies par deux d'entre nous, nous avons examiné des sérums positifs et négatifs : 150 au total dont : 50 négatifs et 100 reconnus positifs à la réaction de Bordet-Wassermann. Les résultats avaient été les suivants :

1° 50 sérums négatifs sont restés négatifs quel que fût le médicament employé ;

2° Sur 100 sérums positifs, 50 ont été soumis à l'action des sels de mercure.

Après contact avec le cyanure de mercure : 37 sérums sont restés positifs ; 9 ont donné une hémolyse partielle ; 4 (sérums 9 et 18) ont donné une hémolyse totale.

Bi-iodure de mercure : 39 sérums sont restés positifs ; 6 sérums ont donné une hémolyse partielle ; 5 sérums (n^{os} 9 et 18) ont donné une hémolyse totale.

Benzoate de mercure : 21 sérums sont restés positifs ; 25 sérums ont donné une hémolyse totale (parmi lesquels n^{os} 9 et 18) ; 4 sérums ont donné une hémolyse partielle.

Bismuth A et B : 30 sérums sont restés positifs.

Néosalvarsan : 20 sérums : 2 sérums sont restés positifs ; 6 ont donné une hémolyse totale ; 3 ont donné une hémolyse partielle.

Dans une deuxième série d'expériences, nous n'avons examiné que des sérums positifs, un grand nombre d'examen pratiqués sur des sérums négatifs nous ayant montré que ceux-ci ne subissent jamais — du point de vue des résultats de la réaction de Bordet-Wassermann — de modifications du fait d'un contact préalable avec les sels dont nous venons de parler.

Dans cette nouvelle série de recherches, nous avons examiné 256 sérums et pratiqué 568 examens. Voici les résultats obtenus :

1° *Mercur*. — Après contact avec le cyanure, 24 sérums deviennent négatifs : 10 présentent une hémolyse totale ; 14 présentent une hémolyse partielle. 96 sérums restent positifs.

Après contact avec le bi-iodure : 32 sérums deviennent négatifs : 14 présentent une hémolyse totale ; 18 présentent une hémolyse partielle. 88 sérums restent positifs.

Après contact avec le benzoate, 40 sérums deviennent négatifs : 30 présentent une hémolyse totale ; 10 présentent une hémolyse partielle. 80 sérums restent positifs.

Ainsi, sur 120 sérums positifs examinés, nous obtenons :

24 cas de négativation pour le cyanure, soit	20	p. 100
32 cas de négativation pour le bi-iodure, soit	26,6	—
40 cas de négativation pour le benzoate, soit	33,5	—

Sur 360 examens pratiqués au total, nous obtenons 96 cas de négativation, soit 26,6 p. 100 comprenant :

54 cas d'hémolyse totale, soit	15	p. 100
42 cas d'hémolyse partielle, soit	11,6	—

Au cours de ces expériences, nous avons observé que la plupart des sérums se comportent vis-à-vis de chaque sel de mercure d'une façon très variable. D'une façon générale, lorsqu'un sérum a donné soit une hémolyse totale, soit une hémolyse partielle avec le bi-iodure ou le cyanure de mercure, il devient franchement négatif avec le benzoate de mercure. La réciproque n'est pas vraie ou l'est rarement. Le benzoate paraît plus actif (*in vitro*, bien entendu), en ce qui concerne la négativation d'un sérum positif, que les deux autres sels de mercure.

2° *Arsenic*. — Le novarsenobenzol ou 914 est le sel d'arsenic le plus employé actuellement en thérapeutique. Pour faire nos dilutions, nous employons l'eau physiologique à 8,5 p. 1.000 au lieu de l'eau bi-distillée employée en clinique pour dissoudre et diluer le novarsenobenzol. Nous craignons, en effet, que la présence de cette eau bi-distillée, bien qu'elle soit en quantité minime, puisse fausser nos résultats en produisant la

lyse totale ou partielle des globules rouges de mouton employés dans la réaction de Bordet-Wassermann. Les dilutions sont faites au moment de l'expérience par crainte des altérations que pourrait subir facilement le novarsenobenzol.

Le taux de nos dilutions est calculé d'après la quantité totale de sel d'arsenic injecté à un syphilitique après une série de novarsenobenzol et rapporté à 5 litres de sang. Nous avons dilué ce sel d'arsenic à 1/3.000, ce qui correspond à une quantité totale de 1 gr. 15 de sel injecté à des doses progressives allant de 0 gr. 15 jusqu'à 0 gr. 60. Nous aurions voulu faire des dilutions correspondant aux quantités totales de novarsenobenzol de 3 gr. 15 et 2 gr. 25 souvent employées dans la thérapeutique courante; malheureusement, ces dilutions sont trop faibles, alcalines, et pourraient fausser notre indication hémolytique (comme nous le dirons plus loin).

Voici les résultats obtenus avec 64 sérums positifs :

Après contact avec le novarsenobenzol à la dilution totale de 1/3.000 :

Deviennent négatifs	18 sérums.
Deviennent partiellement négatifs.	8 —
Restent positifs	38 —

soit 40,6 p. 100 des cas.

Du point de vue de la réaction de Bordet-Wassermann, le novarsenobenzol transforme donc beaucoup plus de sérums positifs en négatifs que les sels de mercure. Ces résultats paraissent concorder avec les observations cliniques.

Nous croyons utile de mentionner ici une série d'expériences pratiquées à côté des précédentes et qui nous ont conduit à des résultats non moins intéressants. Nous faisons des dilutions de novarsenobenzol de taux allant de 1/500 à 1/1.000; nous les mettons en contact, à l'étuve à 37° pendant une heure, avec des sérums franchement positifs ou négatifs, déterminés par une réaction de Bordet-Wassermann. Voici les résultats donnés par 80 examens pratiqués sur 40 sérums : 20 positifs et 20 négatifs. (Pour bien apprécier le degré d'hémolyse des différents tubes de réaction, nous empruntons les notations de l'échelle colorimétrique de Vernes, allant de H₀ à H₈).

Après contact avec la dilution de novarsenobenzol au

1/1.000 (dilution totale après le mélange avec le sérum, 1/2.000) :

a) Les sérums positifs restent positifs ; mais les tubes témoins ne donnent qu'une hémolyse partielle correspondant à H_6 de l'échelle de Vernes.

b) Les sérums négatifs présentent et dans les tubes de réaction et dans les tubes témoins une hémolyse partielle variant de H_5 à H_7 .

2° Après contact avec la dilution de novarsenobenzol au 1/500 (dilution totale : 1/1.000) :

a) Les sérums positifs restent positifs, mais les tubes témoins présentent une hémolyse partielle correspondant à H_4 , ou ne subissent pas le phénomène de l'hémolyse ; tout se passe comme si les sérums examinés étaient devenus fixateurs, ou comme si la solution de novarsenobenzol ajoutée était susceptible d'agir sur la déviation de complément ;

b) Les sérums négatifs deviennent franchement positifs, tandis que les tubes témoins présentent une hémolyse partielle variant avec les sérums de H_3 à H_4 .

Il existe donc pour les sels d'arsenic, comme pour les sels de mercure, une dilution limite au-dessous de laquelle les sels arsenicaux rendent positives les réactions négatives.

3° *Bismuth*. — Après contact avec du bismuth (bismuth C à la dilution totale de 1/10.000) : 4 sérums deviennent négatifs ; 10 sérums deviennent partiellement négatifs ; 58 sérums restent positifs.

Après contact avec le même sel à la dilution totale de 1/25.000, aucun sérum ne devient négatif ; 10 sérums ne donnent plus qu'une hémolyse partielle ; 62 sérums restent positifs.

Ainsi, sur 144 examens pratiqués avec 72 sérums, nous obtenons 24 cas de négativation, soit 16,6 p. 100, comprenant :

7 cas pour la dilution au 1/10.000, soit	19,4 p. 100
5 cas pour la dilution au 1/25.000, soit.	13,8 p. 100

Le nombre de sérums devenant négatifs est, certes, inférieur à celui obtenu avec les sels de mercure et d'arsenic. Mais nous avons obtenu cette fois des cas de négativation, alors que dans

les expériences antérieures nous n'en avons observé aucun. Cette différence tient sans doute au choix du sel de bismuth. N'avons-nous pas observé des différences considérables de sensibilité entre différents sérums vis-à-vis du cyanure, du bi-iodure ou du benzoate? Il en serait de même pour les sels de bismuth. Il y a peut-être aussi une question de « série », et il sera nécessaire de multiplier les expériences.

En résumé, sur 568 examens que nous avons pratiqués sur 236 sérums franchement positifs, préalablement soumis à l'action des différents sels de mercure, d'arsenic et de bismuth, nous avons observé 146 cas de négativation à la réaction de Bordet-Wassermann, soit 23,7 p. 100 des cas comprenant :

96 cas pour les sels de mercure et 1 pourcentage.	26,6 p. 100
24 cas pour le bismuth et 1 pourcentage	16,6 —
26 cas pour le novarsenobenzol.	48,6 —

Il est évidemment fort difficile d'interpréter les expériences que nous venons d'exposer. Mais, en dehors de l'intérêt théorique qu'elles présentent, elles semblent susceptibles d'applications intéressantes. Une réaction de fixation du complément, faite sur des sérums préalablement mis en présence de médicaments antisyphilitiques, permettra, sinon de choisir le sel à employer en thérapeutique, tout au moins d'avoir une présomption sur la sensibilité sanguine de l'individu à tel ou tel médicament. On pourrait avoir ainsi un « hémotest » susceptible d'aider le clinicien dans le choix d'un traitement antisyphilitique. On pourrait peut-être aussi, en se basant sur les recherches précédentes, donner dans certains cas de Bordet-Wassermann paradoxaux une interprétation que la clinique est actuellement impuissante à fournir.

BIBLIOGRAPHIE

- [1] ALESSANDRO et GAGLIO. *Zeitschr. f. Immunitätsf.*, 80, 1933, p. 59.
- [2] BARRON et HARROP. *Journ. exp. Medic.*, 48, 1928, p. 207.
- [3] CASONI in GOUGEROT et PARENT (11).
- [4] DOLRI et BRUCK in GOUGEROT et PARENT (11).
- [5] DUJARRIC DE LA RIVIÈRE (R.). *L'Immunité par mécanisme physico-chimique*, 1 vol., 1934, Masson, édit.
- [6] DUJARRIC DE LA RIVIÈRE (R.) et KOSSOVITCH (N.). *Ces Annales*, 51, août 1933, p. 149; *C. R. Soc. Biologie*, 115, 1934, p. 32, et 116, p. 373.

- 7, DUJARRIC DE LA RIVIÈRE (R.) et HOANG TICH TRY. *C. R. Soc. Biologie*, **118**, n° 13, p. 1270.
- [8] ENGFELDT. *Zeitschr. für Phys. Chemie*, 1920, **112**, p. 176.
- [9] EPSTEIN et PRIBRAM. *Wien. klin.*, n° 23, 1926, p. 649; n° 24, p. 695.
- [10] FERRATA. *Berliner klin. Woch.*, 1907, p. 366.
- [11] GOUGEROT et PARENT. *Ann. maladies vénériennes*, 1911, p. 829.
- [12] GRÉGOIRE. *C. R. Soc. Chimie Biol.*, septembre-octobre, n° 8, 1932, p. 1094-1106.
- [13] GRENET DOUIN. *C. R. Soc. de Biol.*, 14 février 1920, p. 143.
- [14] HOANG TICH TRY. Réaction de Bordet-Wassermann avec des sérums syphilitiques préalablement soumis à l'action de certains médicaments antisypilitiques. *Thèse de médecine*, Paris, 1935, Jouve, édit., Paris.
- [15] JOLTRAIN. Nouvelles méthodes de sérodiagnostic. 1 vol., 1911. Doin, édit.
- [16] KIRALYFI, in GOUGEROT et PARENT (11).
- [17] LECOMTE DU NOUY. La Sérologie à la lumière des données nouvelles sur les propriétés physicochimiques des sérums. *Soc. fr. de Sérologie*, 1933.
- [18] MARRIOTT. *Journ. of Biol. Chem.*, **18**, 1914, p. 507.
- [19] SACHS et ALTMANN. *Bioch. Zeitschr.*, **78**, 1917, p. 46.
- [20] SATTI et DONATI, in GOUGEROT et PARENT (11).
- [21] SIEGLER (A.) et SORU (E.). *Arch. roumaines de Path. exp. et microb.*, **6**, n° 3, 1933, p. 218.
- [22] SNAPPER et GRUNBAUM. *Biochem. Zeitschr.*, 1926, 1881, p. 418.
- [23] WARBURG, KUDOWITZ et CHRISTIAN. *Biochem. Zeitschr.*, 1930, 227, p. 245.
- [24] WENDEL. *Proc. Soc. Exp. Biol. and Med.*, **27**, 1930, p. 624.

ETUDES SUR LES ANTIGÈNES FIXATEURS DU BACILLE TUBERCULEUX

(DEUXIÈME MÉMOIRE)

ESSAIS DE PURIFICATION ET DE FRACTIONNEMENT DES FRACTIONS LIPOIDIQUES ACTIVES COMME HAPTÈNES, EXTRAITES DE BACILLES TUÉS PAR LA CHALEUR

par MICHEL A. MACHEBOËUF et ANTOINE BONNEFOI

(Institut Pasteur. Laboratoires de la Tuberculose.)

Dans un mémoire antérieur [1] nous avons indiqué une méthode d'extraction et de fractionnement des lipides du bacille tuberculeux chauffé. Les lipides sont ainsi divisés en une série de fractions bien différenciées.

Dans un deuxième mémoire [2], il fut montré que parmi toutes ces fractions une seule présente la propriété de fixer l'alexine en présence de sérums d'animaux tuberculeux; cette fraction se rapproche des phosphatides par ses caractères de solubilité; elle s'en éloigne cependant par certains caractères de sa constitution chimique. Nous avons déjà conclu que cette fraction n'était pas une substance pure, bien que son activité haptène soit déjà extrêmement élevée.

Nous avons poursuivi nos tentatives d'isolement de la substance qui agit comme haptène, et, si nous ne sommes pas encore parvenus à l'obtention d'une substance pure, les essais que nous décrivons ici nous ont cependant fait franchir une nouvelle étape dans cette voie.

Pour ces essais nous avons mis en œuvre 3 kilogrammes de bacilles tuberculeux tués par la chaleur (1). Ces corps bacillaires furent lavés rapidement deux fois seulement sur un filtre de Büchner au moyen d'eau distillée; ils furent ensuite

(1) Ces bacilles provenaient du service de la tuberculine de l'Institut Pasteur. (Voir Mémoire antérieur [1]).

déshydratés et débarrassés des lipides extractibles par l'acétone (fraction A des mémoires antérieurs) par de nombreux épuisements par ce solvant. Les corps bacillaires furent ensuite épuisés par de l'alcool éthylique concentré (96°) et bouillant. Par refroidissement des solutions alcooliques, précipitait une fraction inactive qui était reprise une fois encore par de l'alcool, puis éliminée (fraction C).

Les solutions alcooliques froides rassemblées furent évaporées par distillation dans le vide, le résidu desséché fut repris par du chloroforme afin d'en éliminer les parties insolubles dans ce solvant. La solution chloroformique (fraction B) fut enfin additionnée d'acétone refroidi qui fit apparaître un abondant précipité qui constitue la fraction B₂ dans laquelle, nous l'avons déjà vu, est rassemblée la presque totalité de l'activité haptène des lipides du bacille tuberculeux.

Pour éliminer mieux les substances acétono-solubles inactives nous avons renouvelé deux fois encore la précipitation par l'acétone froid.

Le précipité ainsi obtenu (*fraction B₂*) est la fraction active telle que nous l'avons définie précédemment [1 et 2] ; c'est cette fraction qui fut notre matière première ; sa teneur en phosphore était 3,80 p. 100, sa teneur en azote 2,36 p. 100 ; son activité haptène était très grande, nous la représenterons par le chiffre 800, qui est la dilution limite à laquelle on peut porter une solution mère contenant 1 milligramme par centimètre cube pour que 0 c. c. 25 de la dilution fixe totalement l'alexine dans les conditions arbitraires que nous nous sommes fixées (1).

Après divers essais préliminaires, il nous restait 6 gr. 44 de fraction active B₂ ; nous en avons gardé 0 gr. 64 pour les comparaisons ultérieures et nous avons divisé le reste en deux échantillons identiques de 2 gr. 9 que nous avons dissous

(1) Ces conditions étaient : 1° : 0 c. c. 25 d'une suspension de globules rouges de mouton correspondant à du sang de mouton dilué au 1/10^e ; 2° : 2 1/2 doses minima actives d'alexine de cobaye ; 3° : volume total lors de l'hémolyse 1 c. c. 25 ; 4° : durée du séjour à l'étuve à 37° pour fixer l'alexine : une heure ; ° : séjour à l'étuve pour l'hémolyse : trente minutes. Nous donnons toujours comme valeur de l'activité la moyenne des résultats d'au moins trois déterminations indépendantes effectuées avec des alexines et des globules différents. Nous avons chaque fois standardisé autant qu'il est possible, en titrant l'activité d'une préparation connue et bien étudiée. Dans ces conditions, la valeur haptène des substances contenues dans l'« antigène méthylique de Boquet et Nègre » est à peu près égale à 100 ou 120.

séparément dans 20 centimètres cubes de chloroforme. Chacun de ces échantillons fut traité d'une façon différente : l'un fut soumis à une série de précipitations par l'acétone, l'autre fut soumis à une série de précipitations par l'alcool méthylique refroidi.

PRÉCIPITATIONS RÉPÉTÉES PAR L'ACÉTONE.

Aux 20 centimètres cubes de solution chloroformique qui contenaient 2 gr. 88 de substances, on ajoute progressivement et en agitant 32 centimètres cubes d'acétone rectifiée (une addition ultérieure d'acétone n'amènerait pas une augmentation de la précipitation). Le tout est porté dans une glacière à $+ 4^{\circ}$ dans laquelle on laisse sous atmosphère inerte d'azote pendant une nuit.

Le précipité est recueilli après centrifugation, puis remis en solution dans 20 cent. cubes de chloroforme ; la précipitation est renouvelée ainsi chaque jour dans les mêmes conditions. La solution mère chloroformo-acétonique obtenue lors de chaque précipitation est évaporée à sec dans le vide, le résidu est desséché, puis pesé et analysé et son activité haptène est étudiée.

Ces résultats sont rassemblés dans le tableau n° 1 ; ils montrent que la précipitation des substances actives par l'acétone est à très peu près quantitative. Lors de la quatrième précipitation, par exemple, le précipité représente 98,7 p. 100 de l'ensemble, et ce qui reste dans les eaux-mères (1,3 p. 100) est peu actif comme haptène.

La répétition des précipitations par l'acétone dans les conditions fixées ici ($+ 4^{\circ}$, 20 parties de chloroforme, 32 parties d'acétone) ne change rien à l'activité haptène de la fraction active, elle ne modifie pas non plus sa constitution chimique. Dans ces conditions donc, la précipitation par l'acétone est incapable de fractionner la fraction active B_2 , car elle en précipite quantitativement les divers constituants (1). En se basant sur ce résultat, on aurait pu penser que l'activité haptène des lipides du bacille tuberculeux était dévolue à l'ensemble des lipides phosphorés très peu solubles dans l'acétone et dans le

(1) Si l'on utilise un grand excès d'acétone, la précipitation n'est plus aussi quantitative.

TABLEAU I. — Précipitations répétées de B₂ par l'acétone à partir de sa solution chloroformique.

Fraction B₂ initiale. { Phosphore, p. 100 . 3,79
 Poids : 2 gr. 88. { Azote, p. 100 . 2,36
 { Activité haptène . . 900

dissolution dans 20 cent. cubes de chloroforme,
 précipitation par addition de 32 cent. cubes
 d'acétone à la température de + 4°.

Contenu de la solution mère n° 1.		Précipité n° 1.	
Poids. . .	0 gr. 154	Dissous dans 20 cent. cubes de chloroforme, précipitation par 32 cent. cubes d'acétone à + 4°.	
P. p. 100 .	3,6		
N. p. 100 .	3,45		
A. H. . .	700		
Contenu de la solution mère n° 2.		Précipité n° 2.	
Poids. . .	0 gr. 060	Dissous dans 20 cent. cubes de chloroforme, précipitation par 32 cent. cubes d'acétone à + 4°.	
A. H. . .	70		
Contenu de la solution mère n° 3.		Précipité n° 3.	
Poids. . .	0 gr. 041	Dissous dans 20 cent. cubes de chloroforme, précipitation par 32 cent. cubes d'acétone à + 4°.	
A. H. . .	100		
Contenu de la solution mère n° 4.		Précipité n° 4.	
Poids. . .	0 gr. 0335	Poids. . .	2 gr. 573
A. H. . .	75	P. p. 100 .	3,70
		N. p. 100 .	2,35
		A. H. . .	800 à 900

mélange chloroforme-acétone qui sont rassemblés pour constituer la fraction B₂, et que ces divers lipides voisins des phosphoaminolipides sont tous des haptènes très actifs. Nous allons voir cependant qu'il est possible de fractionner la fraction B₂ en une série de sous-fractions d'activités très différentes et, qui mieux est, de constitutions chimiques très dissemblables.

PRÉCIPITATIONS RÉPÉTÉES PAR L'ALCOOL MÉTHYLIQUE REFROIDI
A PARTIR DE LA SOLUTION CHLOROFORMIQUE.

Après avoir effectué divers essais plus ou moins fructueux, nous avons utilisé, pour effectuer le fractionnement, un mélange refroidi de chloroforme et d'alcool méthylique. Chacun de ces deux solvants est capable de dissoudre l'ensemble de la fraction B₂ s'il est utilisé en quantité suffisante et à une température pas trop basse; il ne s'agit donc plus ici d'une insolubilité à peu près rigoureuse dans le solvant précipitant comme dans le cas de l'acétone étudié ci-dessus.

PRINCIPE. — Si, à une solution chloroformique pas trop diluée et froide de B₂, on ajoute progressivement de petites quantités d'alcool méthylique refroidi à 0°, on constate qu'il apparaît un précipité qui s'accroît tout d'abord par addition de nouvelles quantités d'alcool méthylique. Si, cependant, on ajoute un excès d'alcool méthylique, une partie du précipité passe en dissolution. L'optimum de précipitation se présente lorsque l'on ajoute à la solution chloroformique un volume à peu près égal d'alcool méthylique. Le précipité est, d'autre part, beaucoup plus abondant à la température de la glace fondante qu'à la température ordinaire.

C'est cette méthode de précipitation qui nous a donné jusqu'ici les meilleurs résultats, et voici comment nous avons opéré :

TECHNIQUE. — Nous sommes partis de 20 cent. cubes d'une solution chloroformique contenant 2 gr. 9 de la fraction B₂, il nous a fallu ajouter 19 cent. cubes d'alcool méthylique pour atteindre l'optimum de précipitation; le tout a été laissé en repos dans la glacière, pendant une nuit, sous atmosphère d'azote. Le précipité était ensuite séparé par filtration sur un filtre d'Iéna maintenu à 0°.

Le précipité, qui ne pesait que 1 gramme environ, fut dissous dans 10 cent. cubes de chloroforme et une nouvelle précipitation fut effectuée comme précédemment, mais il a suffi de 9 cent. cubes d'alcool méthylique.

Une série de trois nouvelles précipitations successives fut ainsi effectuée dans des conditions identiques, mais en adaptant chaque fois approximativement les volumes des solvants aux poids décroissants des précipités successifs.

Les volumes des solvants utilisés, ainsi que les divers

TABLEAU II. — Fractionnement de B₂ par des précipitations répétées par l'alcool méthylique à partir de sa solution chloroformique à la température de 0°.

Fraction B₂ { Phosphore, p. 100. 3,79
initiale. { Azote, p. 100 . . . 2,36
Poids : 2 gr. 88. { Activité haptène . 900
Dissolution dans 20 cent. cubes de chloro-
forme, précipitation par 19 cent. cubes
d'alcool méthylique.

<i>Contenu de la solution mère n° 1.</i>	<i>Précipité n° 1.</i>
Poids. . . 1 gr. 925	Dissolution dans 10
P. p. 100 . 3,88	cent. cubes de chlo-
N. p. 100 . 2,61	roforme, précipi-
A. H. . . . 450	tation par 9 cent.
	cubes d'alcool mé-
	thylique.

<i>Contenu de la solution mère n° 2.</i>	<i>Précipité n° 2.</i>
Poids. . . 0 gr. 280	Dissolution dans 10 cent.
P. p. 100 . 3,77	cubes de chloro-
A. H. . . . 600	forme, précipitation par
	12 cent. cubes d'al-
	cool méthylique.

<i>Contenu de la solution mère n° 3.</i>	<i>Précipité n° 3.</i>
Poids. . . 0 gr. 188	Dissolution dans 5 cent.
P. p. 100 . 3,34	cubes de chloro-
A. H. . . . 750	forme, précipitation par
	4 cent. cubes d'al-
	cool méthylique.

<i>Contenu de la solution mère n° 4.</i>	<i>Précipité n° 4.</i>
Poids. . . 0 gr. 045	Dissolution dans 5 cent.
A. H. . . . (700)	cubes de chloro-
	forme, précipitation par
	5 cent. cubes d'al-
	cool méthylique.

<i>Contenu de la solution mère n° 5.</i>	<i>Précipité n° 5.</i>
Poids. . . 0 gr. 069	Poids . . . 0 gr. 369
P. p. 100 . 3,36	P. p. 100 . 3,32
A. H. . . . 1.300	N. p. 100 . 1,43
	A. H. . . . 1.500

résultats obtenus en étudiant les diverses solutions mères successives sont indiqués dans le *tableau n° 2*.

Quelques faits se dégagent de ces résultats :

1° La fraction acétono-précipitable B₃ est fractionnée en six sous-fractions dont les activités haptènes diffèrent très notablement (450 à 1.500);

2° Les sous-fractions les plus actives sont les plus facilement précipitables par l'alcool méthylique froid;

3° Toutes les fractions sont très riches en phosphore et leurs teneurs en cet élément ne sont pas très différentes (3,3 à 3,9).

4° Les teneurs en azote varient au contraire très notablement (1,4 à 2,6) et les sous-fractions les plus pauvres en azote sont les plus actives;

5° Si l'on répète plusieurs fois la précipitation par l'alcool méthylique à partir de la solution chloroformique, on atteint rapidement une limite de purification, car les substances restant dans les eaux-mères et le précipité lui-même ont alors des activités et des constitutions identiques. Nous ne pensons cependant pas qu'il s'agisse d'une substance pure, car d'autres essais en cours semblent démontrer que le fractionnement peut être poussé plus loin encore par d'autres méthodes.

CONCLUSIONS.

1° Nous avons confirmé que la totalité de l'activité haptène des lipides du bacille tuberculeux est liée aux substances très peu solubles dans l'acétone.

2° Si l'on répète un certain nombre de fois la précipitation par l'acétone à partir d'une solution chloroformique, dans les conditions de l'optimum de précipitation, on parvient très rapidement à une limite, et la répétition ultérieure de la précipitation acétonique n'augmente pas la pureté. Toutes les substances actives et d'autres lipides phosphorés qui les accompagnent précipitent ensemble presque quantitativement. La précipitation acétonique, dans ces conditions tout au moins, n'est donc pas un moyen de pousser très avant la purification.

3° La fraction précipitée par l'acétone a une constitution très constante, elle n'est cependant pas une substance définie car on peut la fractionner par une série de précipitations

méthodiques effectuées en ajoutant de l'alcool méthylique refroidi à sa solution chloroformique. Les sous-fractions ainsi obtenues ont des activités haptènes qui varient du simple au triple tandis que leurs teneurs en azote varient inversement du double au simple environ. Les teneurs en phosphore varient assez peu les unes des autres (3,8 à 3,3) ; il semble donc que la fraction active isolée par l'acétone soit un mélange de lipides phosphorés dont les activités haptènes et les teneurs en azote sont très variables, certains sont très peu actifs, peut-être même inactifs, et riches en azote, tandis que d'autres sont des haptènes de hautes activités et pauvres en azote.

4° La répétition des précipitations par l'alcool méthylique froid à partir des solutions chloroformiques, ne peut pas conduire avec un rendement appréciable à l'obtention d'une substance active pure, car les différences entre les solubilités des substances actives et peu (ou pas) actives dans le mélange chloroforme-alcool méthylique sont trop faibles; on parvient, en effet, après plusieurs opérations, à avoir dans les eaux-mères des fractions d'activité presque égales à celles des précipités.

5° La fraction la plus active (la plus facilement précipitable par l'alcool méthylique) présente une activité haptène extrêmement intense, correspondant à peu près à 12 à 15 fois celle d'un poids égal des substances contenues dans la solution d'« anti-gène méthylique » de Boquet et Nègre. Notre fraction la plus active ne doit cependant pas encore être considérée comme une substance chimiquement pure.

BIBLIOGRAPHIE

- [1] MACHEBOEUF (M.), LÉVY (G.), FETHKE (N.), DIERYCK (J.) et BONNEFOI (A.), Études chimiques sur le bacille tuberculeux. 1^{er} mémoire : Essais préliminaires d'extraction et de fractionnement des substances lipoidiques de corps bacillaires tués par la chaleur. Ces *Annales*, 52, 1934, p. 277 à 308 et *Bull. Soc. Chim. biol.*, 16, 1934, p. 353 à 384.
- [2] MACHEBOEUF (M.), LÉVY (G.) et CHAMBAZ (A.), Etudes sur les antigènes fixateurs des bacilles tuberculeux. 1^{er} mémoire : Antigènes fixateurs contenus dans les substances lipoidiques extraites de bacilles tués par la chaleur. Ces *Annales*, 53, 1934, p. 591 à 598.
- [3] MACHEBOEUF (M.), DIERYCK (J.) et STOOP (R.), Etudes chimiques sur le bacille tuberculeux. 2^e mémoire : Extraction fractionnée des diverses substances lipoidiques de bacilles frais et non chauffés. Ces *Annales*, 54, 1935, p. 71 à 86.

**LA RÉACTION DE FIXATION DU COMPLÉMENT
DANS LE SCLÉROME,
COMME MÉTHODE DE CONTROLE
DE L'EFFICACITÉ DU TRAITEMENT**

par W. M. GUERKESSE,
chef du Service sérologique de l'Institut
et S. M. ALOUKÈRE,
assistant de Clinique.

(Institut de Microbiologie et d'Épidémiologie [directeur administratif : D^r J. S. ROUBINSTEIN; directeur scientifique : Prof. S. M. FRIDE] et Clinique des Maladies de l'Oreille, du Nez et du Larynx [directeur : Prof. S. M. BAURAK] de l'Institut de Médecine de la Russie blanche soviétique [Minsk]).

Nous nous sommes proposé de résoudre, dans le présent travail, une question purement pratique, peu étudiée jusqu'ici, notamment, de savoir, si, à côté de sa valeur diagnostique dans le sclérome, la réaction de fixation du complément peut servir en même temps de méthode de contrôle de l'efficacité des résultats thérapeutiques, comme cela est observé, par exemple, dans la syphilis et dans d'autres maladies.

D'après les données d'une série d'auteurs (Streit, Neuber, Pricka, Kabelik, Elberte, Tomaszek, Jacoubowsky, Kalina, Tougounowa, Viroboff, etc.), ainsi que d'après l'étude d'une grande quantité de malades observés à l'Institut microbiologique et à la Clinique oto-rhino-laryngologique depuis une dizaine d'années, de même que d'après une vaste documentation recueillie au cours de plusieurs expéditions scientifiques pour l'étude des foyers de sclérome en Russie blanche, il faut reconnaître que la valeur de la réaction dans le sclérome, tant au point de vue de la spécificité qu'au point de vue de la sensibilité, est actuellement indubitable. La sous-estimation de cette

réaction par certains auteurs ne peut être expliquée, à notre avis, que par des imperfections dans la pratique.

L'expérience de plusieurs années nous a démontré l'importance des méthodes précises, du choix des antigènes convenables, de leur titrage, etc., dans le jugement de la spécificité de la fixation du complément dans le sclérome.

Le choix de l'antigène est rendu facile chez nous grâce au riche musée de cultures de bacilles du sclérome et autres appartenant au groupe des bactéries encapsulées dont nous disposons. De cette manière, nous réussissons toujours à trouver des souches dont l'antigène présente une grande spécificité et une sensibilité élevée.

Pour la réaction de Bordet-Gengou, nous nous servons, comme antigène, d'émulsions de bacilles de Frisch : dans un tube de gélose glycinée ensemencée depuis vingt-quatre heures, avec du bacille de Frisch, on verse 5 cent. cubes de solution physiologique et on laisse reposer durant une heure. Puis, la culture est lavée et diluée avec de l'eau physiologique en quantité telle que l'épaisseur de l'émulsion reste égale au standard de 3 milliards. L'émulsion est chauffée au bain-marie à 65° pendant une heure. Parallèlement à cet antigène, nous utilisons un antigène polyvalent. Le mode de préparation de l'antigène polyvalent constant (Guérkesse) consiste en ceci : les cultures sur milieu glyciné âgées de vingt-quatre heures sont lavées avec une solution physiologique phénolée (0,5 p. 100), émulsionnées de façon à obtenir une masse très épaisse. Cette masse agitée dans un ballon stérile contenant des billes de verre, est chauffée pendant une heure à 80° et ensuite titrée en présence de sérums bien connus d'origine scléromateuse et non scléromateuse. Avant l'emploi, l'antigène est dilué extemporanément avec de la solution physiologique.

Essayé par nous (Guérkesse) sur un grand nombre des sérums provenant de malades scléromateux certains et de sujets non scléromateux, cet antigène s'est montré stable, très spécifique et susceptible de conserver son activité et son titre pendant environ une année.

En outre, nous utilisons des antigènes hétérologues (bacille de Friedlaender, *B. aerogenes*, etc.), préparés de la même manière. Le sérum hémolytique est employé à la dose triple

et quadruple, le complément à la dilution de 1,17; les globules de mouton à 3 p. 100 (du sédiment des érythrocytes décantés). Le sérum inactivé du malade est dilué à 1 p. 5.

On verse dans six tubes 0 c. c. 5 de sérum dilué, 0 c. c. 5 de complément dilué et des doses décroissantes d'antigène scléromateux (émulsion à 3 milliards et antigène constant selon le titre): 0 c. c. 5 dans le premier tube, 0 c. c. 4 dans le deuxième, 0 c. c. 3 dans le troisième, 0 c. c. 2 dans le quatrième, 0 c. c. 1 dans le cinquième; on complète avec de l'eau physiologique jusqu'à 1 c. c. 5 et on laisse les tubes à l'étuve pendant cinquante ou soixante minutes. Ensuite, on ajoute le système hémolytique (sensibilisation à 37° pendant une demi-heure) et on laisse les tubes au thermostat pendant trente à quarante-cinq minutes, après quoi on les laisse à la température du laboratoire pendant une heure.

En dehors du sérum du malade, on fait un contrôle avec deux ou trois sérums normaux. En cas de quantité insuffisante de sérum, on peut pratiquer la réaction avec des doses moitié moindres.

L'appréciation des résultats de la réaction se fait au bout de deux heures et le lendemain; ils sont considérés comme positifs si les cinq tubes ne présentent pas d'hémolyse (++++), et si le contrôle présente une hémolyse totale. Le résultat est faiblement positif, lorsque les deux ou trois premiers tubes seuls ne sont pas hémolysés (+++, ++).

En ce qui concerne la valeur de la réaction au point de vue du contrôle des résultats du traitement du sclérome, nous n'avons trouvé, dans la bibliographie qui était à notre disposition, que des notions bien succinctes. C'est seulement dans la communication de Streit faite en 1932 au Congrès international de Madrid et consacrée à l'étiologie du sclérome que nous avons relevé une citation des travaux de Neuber et de Goldzieher qui soulignent une diminution et même une disparition totale de la substance spécifique (à caractère d'antigène), contenue dans le sang du malade scléromateux, observée au cours du traitement employé.

Nos recherches ont porté sur 100 malades scléromateux, dont 68 ont été observés pendant longtemps et à plusieurs reprises.

Une grande partie des malades retournaient chez eux après avoir fait une cure et cessaient de pouvoir être observés.

Les traitements utilisés par nous étaient les suivants :

1° Méthode chirurgicale, comprenant une ou plusieurs laryngostomies avec ablation des infiltrats scléromateux et pose d'une canule de caoutchouc en T ;

2° Administration intraveineuse de préparations d'antimoine (tartre stibié à 1 p. 100) jusqu'à la dose totale de 200 cent. cubes, en commençant par 1 cent. cube pour aboutir à 15 à 20 cent. cubes en une seule injection ;

3° Injections intraveineuses de chlorure de calcium à 5 à 10 p. 100 jusqu'à la dose totale de 200 cent. cubes, en débutant par 5 cent. cubes d'une solution à 5 p. 100 et en terminant par 20 cent. cubes d'une solution à 10 p. 100 en une fois ;

4° Méthode de malariathérapie, consistant en l'inoculation de paludisme du type de fièvre tierce ; le nombre des accès allant parfois jusqu'à 20 avec guérison par l'administration de quinine ;

5° Méthode de radiothérapie comprenant plusieurs séries de rayons à des intervalles de trois à six mois ; chaque série consistant en trois ou quatre séances de 3 à 6 H, au total de vingt à trente séances pour tout le traitement ;

6° Méthodes combinées, mixtes : association, par exemple, des injections intraveineuses du chlorure de calcium ou de tartre stibié avec les moyens chirurgicaux ou de la vaccination antiscléromateuse avec la radiothérapie, etc.

Ces indications sont résumées dans le tableau suivant :

TABLEAU I.

Nombre de cas : Hommes, 30 ; Femmes, 38.

Jusqu'à 15 ans	6
De 15 à 20 ans	22
De 20 à 39 ans	29
De 30 à 40 ans	6
Au-dessus de 40 ans	5

Localisation du processus.

Nez.	1
Naso-pharynx.	1
Larynx	22
Trachée.	2
Larynx et trachée.	6
Multiples	36

Méthodes de traitement.

Rayons X.	22
Tartre stérilisé	14
Chlorure de calcium	13
Malariathérapie.	4
Traitement chirurgical	9
Vaccinothérapie	1
Mixte	5

Durée de l'observation.

6 mois	7
1 an	23
1 an 1/2	25
2 ans	8
Plus de 2 ans	15

L'examen du sang était pratiqué, dans la règle, avant et après le traitement, ainsi qu'après des délais déterminés, lors des consultations ultérieures du malade à la clinique. La réaction de fixation était pratiquée par nous simultanément avec plusieurs antigènes de différentes souches du bacille de Frisch, sous forme d'émulsion chauffée, avec antigène constant et toute une série d'antigènes hétérologues. Pendant toute la durée de l'observation, le sang du malade était examiné d'après la même méthode. Dans un grand nombre de cas, on faisait parallèlement la réaction d'agglutination. Le total des réactions de Bordet-Gengou effectuées par nous est de 298, celui des réactions d'agglutination de 100. Le nombre d'examens de sang fait pour chaque malade variait de 2 à 3. Les intervalles écoulés entre la fin du traitement et l'examen du sang, allaient d'un mois à trois ans. Les délais d'observation des malades sont représentés sur le tableau II.

TABLEAU II.

Termes d'observations des malades après la fin du traitement.

1 mois	15
2 mois	21
3 mois	7
6 mois	7
9 mois	11
1 an	9
1 an et 3 mois	4
1 an 1/2	2
2 ans	5
3 ans	5

Au cours de notre travail, nous avons constaté que les données sérologiques concordaient, comme règle, avec les données cliniques tant avant qu'après le traitement (c'est-à-dire que dans les cas de sclérome plus ou moins notoires cliniquement, la réaction de Bordet-Gengou était toujours positive). Il y eut cependant des cas où malgré une amélioration clinique manifeste, les résultats sérologiques avant et après le traitement restaient sans changement (la réaction de Bordet-Gengou donnait toujours + + + +).

Nous avons eu aussi des cas où les données sérologiques ne concordaient pas avec les données cliniques prouvant un sclérome évident (la réaction de Bordet-Gengou était négative).

Le tableau III montre les cas de concordance et de discordance des examens sérologiques avec les faits cliniques.

TABLEAU III.

Concordance des données sérologiques et cliniques (B.-G. + + + +, diagnostic clinique sclérome avant et après le traitement	52
Concordance des données sérologiques et cliniques avant le traitement (B.-G. + + + +, diagnostic clinique sclérome). Discordance après le traitement (B.-G. + + + +, amélioration clinique)	10
Discordance des données sérologiques et cliniques avant le traitement (B.-G. négatif, diagnostic clinique sclérome) . .	6

Ce tableau montre que, dans la majorité des cas, la réaction de Bordet-Gengou reste invariablement positive lorsqu'aucune amélioration clinique ne survient, quelles que soient la méthode et la durée du traitement employé.

Ce fait plaide, d'une part, en faveur de la sensibilité de la réaction, et de l'autre, il permet de penser que nous n'avons évidemment pas encore à notre disposition de traitement radical du sclérome. Il y a pourtant une série des cas (10 parmi 68) où les résultats sérologiques sont restés les mêmes avant et après le traitement, malgré une amélioration clinique nette.

Nous voyons donc que, dans la plupart des cas, les substances fixant le complément ne disparaissent pas de l'organisme du malade scléromateux durant longtemps, même dans les cas où l'on enregistre une amélioration clinique évidente. Il semble donc qu'on ne puisse se fonder uniquement sur les résultats de la réac-

tion de Bordet-Gengou, pour juger de l'efficacité du traitement.

Nous rapportons ci-dessous les résumés des observations des cas les plus caractéristiques :

I. — Ky (G.), âgé de vingt-trois ans, se croit malade depuis un an et demi. Il entre à la clinique, se plaignant de dyspnée intense. Le 13 octobre 1933, on fait une trachéotomie d'urgence. Diagnostic clinique : sclérome.

Le 21 octobre, la réaction de Bordet-Gengou dans le sang a fourni un résultat très positif (++++).

Le malade a été traité par des injections de chlorure de calcium (au total 180 cent. cubes). Il quitte la clinique, le 3 janvier 1934, avec une respiration satisfaisante par les voies naturelles. Les infiltrats de la trachée et de l'entrée des bronches ont diminué, ne saignent plus ; les entrées des bronches sont suffisantes. L'examen du sang montre toujours un Bordet-Gengou fortement positif (++++).

II. — Kh-Ky, âgé de dix-huit ans, se croit malade depuis une année environ. Il se présente à la consultation externe de la clinique à propos d'une respiration embarrassée. Diagnostic clinique : sclérome. La réaction de Bordet-Gengou, faite le 13 novembre 1933, a donné un résultat fortement positif (++++).

Le malade a été traité par des injections intraveineuses de préparations antimoniées à la dose totale de 200 cent. cubes. Au bout de six mois, il s'est présenté pour un examen de contrôle. Il se sent beaucoup mieux ; la respiration n'est pas embarrassée ; le malade exécute un travail physique difficile, comme ouvrier employé aux tourbières ; l'infiltration du naso-pharynx a notablement diminué ; la cloison gauche est nettement visible, elle est généralement rétrécie, ainsi que la droite. L'examen du sang montre toujours un Bordet-Gengou très positif (++++).

III. — K... (Ik.), âgé de quinze ans, se croit malade depuis deux ans ; entre à la clinique, en janvier 1930, avec une respiration très gênée. On lui fait une trachéotomie.

En août 1932, le malade revient à la clinique, se plaignant de dyspnée. Sa réaction de Bordet-Gengou reste toujours très positive.

Le malade a été soumis à l'opération de laryngostomie ; puis on lui a mis à demeure une canule de caoutchouc en T, avec laquelle il est reparti chez lui. Au cours d'un an, le malade a changé à plusieurs reprises sa canule en T.

Au début de septembre 1933, la canule a été complètement enlevée. Le malade respire librement par le nez. Il a reçu des injections intraveineuses de préparation d'antimoine (200 cent. cubes en tout). L'examen du sang avant et après le traitement, fournit toujours une réaction fortement positive (++++).

Le 11 mai 1934, le malade vient de nouveau à la consultation. Il se sent bien, sa voix est forte, il s'adonne au travail physique ; il respire par les voies naturelles.

L'examen du sang, fait le 22 mai, montre le même résultat très positif.

La réaction de fixation du complément négative que nous avons observée dans 6 cas de sclérome confirmé, s'accorde, sous

le rapport de pourcentage, avec les données obtenues par nous sur un matériel nombreux (environ 95 p. 100 de concordance), comprenant plus de 400 cas enregistrés au cours des quatre premières années (1926-1930).

Nous croyons intéressant de citer le résumé de l'observation d'un de ces 6 cas ci-dessus mentionnés.

Ko (P.), âgée de vingt-trois ans, se dit malade depuis une année environ, mais elle ne s'est jamais soignée. Elle s'est présentée à la clinique à cause d'une respiration difficile par le nez.

Diagnostic clinique : sclérome. L'examen du sang a fourni, à deux reprises, un résultat négatif.

L'infiltrat nasal est extirpé. Son examen anatomo-pathologique, pratiqué par le professeur J. T. Titoff, montre un sclérome.

Cependant, la valeur diagnostique de la réaction de fixation est, dans la règle, très précieuse.

Dans la grande majorité des cas, nous avons pratiqué parallèlement la réaction d'agglutination. Le tableau IV représente les résultats de ces réactions parallèles.

TABLEAU IV.

Concordance des réactions de Bordet-Gengou et d'agglutination avant et après le traitement (B.-G. ++++ et réaction d'agglutination positive en dilution de 1 p. 800)	45
Discordance des réactions avant le traitement (réaction de B.-G. ++++, réaction d'agglutination négative	5
Concordance des réactions avant le traitement et discordance après le traitement.	2

Dans la majorité absolue des cas, la réaction d'agglutination concordait avec celle de fixation du complément, ce qui coïncide aussi avec les données que nous avons obtenues et exposées antérieurement. Dans 5 cas, nous avons noté une discordance entre ces deux réactions chez des malades cliniquement scléromateux (réaction de Bordet-Gengou ++++, réaction d'agglutination —). Un intérêt particulier réside dans 2 cas où la discordance entre les deux réactions est survenue après le traitement (la réaction de Bordet-Gengou est demeurée positive, la réaction d'agglutination est devenue négative).

Nous rapportons les résumés des observations relatives à ces deux cas.

I. Gou-K..., âgé de trente-six ans, est entré à la clinique avec des symptômes manifestes de sclérome du type trachéal. Avant le traitement, la réaction de Bordet-Gengou et celle d'agglutination à 1 p. 800 étaient toutes les deux positives. Après la radiothérapie, la réaction de Bordet-Gengou est restée positive, l'agglutination est devenue négative.

II. Kh-Ky..., âgé de dix-huit ans, est entré à la clinique avec un diagnostic de sclérome des voies respiratoires supérieures. Avant le traitement, les deux réactions ont fourni un résultat positif (Bordet-Gengou et agglutination à 1 p. 800). Après un traitement par des préparations antimoniées durant six mois, le Bordet-Gengou n'a pas viré, mais la réaction d'agglutination est devenue négative.

Notons à ce propos qu'au cours de ce travail, notre attention fut attirée par le fait que, dans un cas de sclérome clinique évident, où le Bordet-Gengou était négatif avant le traitement, cette réaction est devenue positive après une cure par des injections intraveineuses de produits stibiés; cette réaction positive s'est maintenue telle à l'examen ultérieur du sang pratiqué huit mois plus tard. Nous nous sommes intéressés à ces données aussi dans le deuxième cas de Bordet-Gengou négatif avant le traitement chez un malade scléromateux notoire. Nous l'avons à dessein soumis au traitement par des composés d'antimoine et nous avons constaté, après le traitement, le passage de la réaction négative en positive. Dans un troisième cas ayant les mêmes caractères sérologiques avant le traitement que les deux précédents, nous avons institué, au début, une cure par injections intraveineuses de chlorure de calcium à 10 p. 100; l'examen du sang, refait après la fin du traitement, n'a montré aucune modification au point de vue sérologique. Après cela, nous avons fait quelques injections intraveineuses des préparations antimoniées, à la suite desquelles nous avons observé également un changement de résultat négatif en positif.

Nous ne prétendons pas tirer des conclusions fermes en nous basant seulement sur 3 cas, mais l'idée s'impose que les composés d'antimoine peuvent être utilisés à titre de réactivants par analogie avec l'emploi du salvarsan comme réactivateur dans la syphilis) dans les cas où, en présence de sclérome, la réaction de Bordet-Gengou est négative, ainsi que dans des cas douteux de sclérome. Nos recherches continuent dans cette direction.

En nous basant sur l'exposé de notre travail, nous pouvons tirer les conclusions que voici :

1° Dans la majorité absolue des cas, la réaction de fixation du complément concorde avec les données cliniques (95 p. 100) ;

2° L'intensité de la réaction de fixation du complément n'est pas en rapport avec la gravité et la localisation de l'affection ;

3° Dans la plupart des cas, durant longtemps et indépendamment du mode de traitement, les substances fixant le complément ne disparaissent pas de l'organisme du malade, ce qui se traduit par une réaction de Bordet-Gengou positive même dans les cas d'amélioration clinique survenue. Donc la réaction de fixation du complément est très stable.

4° La stabilité de la réaction permet de supposer que nous n'avons pas encore à notre disposition de moyens spécifiques de guérison radicale du sclérome.

5° La réaction de fixation du complément ne peut pas toujours, à notre avis, être utilisée comme méthode de contrôle de l'efficacité des modes de traitement employés actuellement.

6° Dans la majorité absolue des cas, la réaction de Bordet-Gengou concorde avec la réaction d'agglutination ; on observe toutefois des cas de discordance de ces réactions après le traitement.

7° On est fondé à croire que les composés d'antimoine peuvent servir à titre de moyens de réactivation sérologiques dans les cas douteux de sclérome.

À PROPOS DES DIFFÉRENTS MODES DE VACCINATION PAR LE BCG

AVANTAGES DE LA MÉTHODE DES DEUX INJECTIONS SOUS-CUTANÉES SIMULTANÉES, VARIATIONS DE LA VIRULENCE DU BCG DANS LA PRÉMUNITION DE L'ESPÈCE HUMAINE

Par R. CHAUSSINAND

(Institut Pasteur de Saïgon. Laboratoire des vaccins.)

Ayant eu, pendant sept ans, l'occasion d'expérimenter dans de bonnes conditions différents modes de vaccination par le BCG, nous avons observé les avantages manifestes de la méthode des deux injections sous-cutanées simultanées. Nous nous proposons de décrire rapidement cette méthode, tout en passant en revue les avantages et les inconvénients des diverses voies d'administration du BCG actuellement en usage. Ensuite, après avoir insisté sur les doses de BCG à employer, nous discuterons la question des variations de virulence du BCG dans la prémunition de l'espèce humaine, constatées entre autres par A. Wallgren et J. Heimbeck.

I. — VACCINATION AU BCG « PER OS ».

La vaccination au BCG par la voie buccale est une méthode simple, élégante et inoffensive. Elle a rapidement conquis la faveur du public et a, de ce fait, puissamment contribué à la diffusion de l'admirable découverte de notre regretté maître Albert Calmette et de son collaborateur Camille Guérin.

Faire absorber le BCG par la bouche est, en effet, une méthode simple, très facilement acceptée par les familles qu'une injection sous-cutanée sur un nouveau-né pourrait effrayer. Mais cette simplicité n'exclut pas une très grande rigueur dans l'exécution. Le vaccin BCG ne peut être utilisé

que pendant les dix jours qui suivent sa préparation, et cela à la condition d'être conservé au frigidaire ou en glacière. Les prescriptions pour l'administration du BCG doivent être strictement appliquées, sinon la vaccination risque de devenir illusoire. On ne saurait donc confier aux familles, au personnel subalterne des maternités, le soin de faire absorber le BCG aux nouveau-nés. Lorsque le contrôle strict du praticien responsable ne s'exerce pas, la simplicité de la méthode peut devenir un danger sur lequel on ne saurait trop appeler l'attention.

En outre, la vaccination au BCG par la voie buccale est une méthode qui présente en elle-même un inconvénient.

Il est démontré, par l'allergie à la tuberculine et par des autopsies d'enfants vaccinés à leur naissance et morts d'infections intercurrentes, que le BCG traverse les parois du tube digestif. Il est donc possible de vacciner au BCG par la voie buccale, et nous sommes personnellement convaincu que la prémunition *per os* peut protéger des enfants contre des contaminations tuberculeuses. Nous avons, en effet, observé des vaccinés qui ont subi ultérieurement sans danger des contacts intimes et prolongés avec des malades atteints de tuberculoses extrêmement graves [1]. Il est donc hors de doute que la voie buccale reste la méthode de choix dans la vaccination contre la tuberculose par le BCG.

Mais, à notre avis, la vaccination *per os* présente l'inconvénient suivant : l'allergie à la tuberculine n'apparaît après vaccination que tardivement et irrégulièrement. Or, on sait que l'isolement des vaccinés de tout contact tuberculeux jusqu'à l'apparition de l'immunité est une mesure indispensable à une vaccination efficace. Nous avons publié en collaboration avec notre maître P. Rohmer [2], sur un total de 51 nouveau-nés vaccinés, 4 cas de tuberculose évolutive aiguë, dont 3 mortels, chez des vaccinés qui n'avaient pas été isolés du milieu contaminateur après leur naissance. Or, comme l'allergie à la tuberculine est actuellement le seul test qui permet d'affirmer que l'organisme du vacciné a retenu du BCG et qu'il peut être, de ce fait, considéré comme réellement prémuni, il faut se baser sur l'apparition de la sensibilité à la tuberculine pour cesser l'isolement du vacciné. A. Calmette, lui-même, déclarait peu de temps avant sa mort : « L'allergie est le seul témoin révélateur

de la prémunition, donc de l'immunité, que nous puissions aujourd'hui pratiquement interroger [3]. »

Nous estimons donc que chez un enfant vacciné au BCG et isolé, l'apparition de la sensibilité à la tuberculine prouve que le sujet est réellement porteur de germes prémunisants. Dès lors, si l'on admet l'efficacité du BCG, la réaction tuberculinique positive donne la certitude que le vacciné se trouve prémuni et qu'il peut être mis, sans danger, en contact avec des tuberculeux. Pour que la vaccination au BCG puisse donner des résultats pratiques, il faut donc que l'allergie s'installe rapidement et régulièrement.

Or, après huit semaines, il n'y a qu'environ 30 p. 100 des nouveau-nés vaccinés *per os* et isolés qui réagissent à la cuti-réaction de Pirquet où à l'intradermo-réaction de Mantoux à 0 milligr. 1 de tuberculine [4]. R. Debré [4], qui cite les chiffres les plus élevés à ce sujet, n'observe encore après trois mois qu'environ 70 p. 100 d'allergiques et, dans ce pourcentage, il compte les enfants qui ne réagissent que d'une façon douteuse à un Mantoux de 1 centigramme de tuberculine. Il sera donc impossible de savoir, encore après trois mois, chez 30 p. 100 au moins des vaccinés, s'ils peuvent être mis, sans danger, dans un milieu tuberculeux.

Chez les enfants du deuxième âge et chez les adolescents, isolés autant que possible de tout contact tuberculeux, la vaccination au BCG par la voie buccale semble donner, au point de vue allergie, des résultats encore plus faibles que chez les nouveau-nés. En effet, trois mois après la vaccination, nous n'avons vu que 17,5 p. 100 de ces sujets réagir à la cuti-réaction [5].

Aussi nous sommes-nous demandé s'il ne serait pas possible d'augmenter le nombre des allergiques après la vaccination *per os* en faisant absorber des doses plus fortes de BCG [4]. Les résultats que nous avons notés [5], aussi bien chez les nouveau-nés que chez les enfants plus âgés, semblent démontrer que la faculté d'absorption de BCG par l'intestin et par son système lymphatique est limitée et que l'ingestion de 6 centigrammes, par exemple, donne au point de vue allergie à la tuberculine des résultats sensiblement équivalents à ceux obtenus avec la dose habituellement employée, c'est-à-dire 3 centigrammes. Pour être fixés définitivement à ce sujet, nous

comptons entreprendre prochainement de nouvelles expériences.

Nous estimons donc qu'il serait préférable de ne pas employer la vaccination au BCG par la voie buccale pour la prémunition d'enfants provenant d'un milieu bacillaire ou suspect et nous pensons qu'il faudrait adopter pour ces enfants la voie sous-cutanée qui rend les vaccinés plus rapidement et plus régulièrement allergiques, ce qui permettrait de fixer une limite précise à leur isolement post-vaccinal. La voie buccale resterait indiquée chez les sujets de milieu sain. Mais, là encore, il faudrait, vers l'âge de deux ans, rechercher l'allergie et revacciner les anergiques soit par la voie buccale, soit plutôt par la voie sous-cutanée, si l'on ne veut pas courir le risque d'exposer ultérieurement un certain nombre d'entre eux à contracter la tuberculose du fait d'une contamination accidentelle.

II. — VACCINATION AU BCG PAR VOIE INTRA-DERMIQUE.

Nous n'avons pas expérimenté nous-mêmes cette voie. Les premières publications de A. Wallgren à ce sujet [6] ne semblaient pas démontrer que la voie intra-dermique présente des avantages notables sur la voie sous-cutanée, ni au point de vue de l'apparition de l'allergie, ni au point de vue de la moindre fréquence des lésions locales post-vaccinales.

Depuis, W. Park et C. Kereszturi, à New-York [7], ont employé parallèlement la voie intra-dermique et la voie sous-cutanée chez 101 nourrissons. Les doses adoptées étaient de 0 milligr. 001 à 0 milligr. 05 de BCG pour la voie sous-cutanée et de 0 milligr. 0,003 à 0 milligr. 3 pour la voie intra-dermique. Ces auteurs observent, à la suite de leurs vaccinations, 60 p. 100 d'abcès froids après injection du BCG sous la peau, et ils notent chez presque tous les vaccinés par voie intra-dermique l'apparition d'une lésion papuleuse, ressemblant à une tuberculide, qui se nécrose au centre dans 50 p. 100 des cas. En ce qui concerne l'allergie, W. Park et C. Kereszturi trouvent, en se servant du Mantoux (la dose de tuberculine n'est pas indiquée), que 90 p. 100 des vaccinés par voie sous-cutanée et 85 p. 100 des vaccinés par voie intra-dermique deviennent tuberculino-positifs quatre à cinq semaines et demie après l'administration du BCG. Le nombre des nourrissons qui

restent encore allergiques après douze mois est d'environ 50 p. 100 pour les vaccinés par voie sous cutanée et de 34 p. 100 seulement pour les vaccinés dans le derme, et cela malgré l'emploi de doses plus fortes de BCG pour la voie intra-dermique.

D'après les expériences de W. Park et C. Kereszturi, la voie sous-cutanée paraît donner de meilleurs résultats au point de vue de l'allergie tuberculinique. En effet, le chiffre des allergiques est légèrement plus élevé et — ce qui est important — il diminue moins rapidement après vaccination sous-cutanée qu'après injection du BCG dans le derme.

La vaccination par la voie sous-cutanée, qui est, d'ailleurs, d'une exécution plus aisée, nous paraît donc préférable à la prémunition par la voie intra-dermique.

III. — VACCINATION AU BCG PAR VOIE INTRA-MUSCULAIRE.

Nous avons expérimenté, en 1930, la voie intra-musculaire pour la prémunition par le BCG des jeunes enfants [8] et nous avons pu observer que cette voie semblait provoquer plus souvent la formation d'abcès froids post-vaccinaux que la voie sous-cutanée. Néanmoins, en adoptant pour la voie intra-musculaire la méthode des deux injections simultanées, on constatait, tout en employant les mêmes doses de BCG, que l'abcès froid devenait moins fréquent.

Le seul avantage de la voie intra-musculaire est l'apparition rapide de l'allergie à la tuberculine. En effet, en injectant les mêmes doses de BCG que dans la vaccination sous-cutanée, on obtient, en général, une cuti-réaction positive déjà au bout de trois à quatre semaines, alors que par voie sous-cutanée cette même réaction n'est positive que vers la sixième semaine.

La voie intra-musculaire, par deux injections simultanées, pourrait donc rendre des services dans la prémunition par le BCG d'enfants qui ne peuvent être isolés que peu de temps de leur milieu bacillifère et chez lesquels il y a intérêt à produire rapidement l'immunité. Mais, sauf pour ce cas, nous préférons la voie sous-cutanée à l'injection intra-musculaire.

IV. — VACCINATION AU BCG PAR VOIE SOUS-CUTANÉE.

L'injection de BCG par la voie sous-cutanée est actuellement, après la prémunition *per os*, le mode de vaccination le plus employé.

Cette méthode présente les avantages suivants : D'abord, comme les vaccinations intra-dermique et intra-musculaire, elle ne peut être pratiquée que par un médecin. L'administration du BCG par la voie sous-cutanée n'échappe donc pas au contrôle médical. Ensuite, tous les expérimentateurs qui ont employé cette voie observent que l'allergie à la tuberculine s'installe plus fréquemment et plus rapidement qu'après la vaccination *per os*. Enfin, la voie sous-cutanée donne au point de vue allergie sensiblement les mêmes résultats chez les enfants du deuxième âge et les adolescents que chez les nouveau-nés.

Par contre, on reproche à cette méthode le fait que l'injection de BCG est quelquefois difficilement acceptée par les familles et qu'elle peut produire l'apparition d'un petit abcès froid, d'ailleurs inoffensif, dont l'évacuation spontanée ou par ponction est gênante. En outre, si l'on compare les résultats des différents auteurs, on constate que l'allergie tuberculinique post-vaccinale apparaît souvent d'une façon irrégulière.

Nous avons donc cherché à modifier la technique de la vaccination au BCG par la voie sous-cutanée dans le but d'obtenir une apparition précoce et régulière de l'allergie tuberculinique, tout en tâchant d'éviter autant que possible la formation d'un abcès froid.

A. MÉTHODE DES DEUX INJECTIONS SOUS-CUTANÉES SIMULTANÉES.
— Nos essais de vaccination effectués à la Clinique infantile de la Faculté de Médecine de Strasbourg (Directeur-Professeur, P. Röhmer), en 1929 [9], ont démontré qu'à doses égales de BCG, l'allergie tuberculinique était obtenue d'une façon plus rapide et plus constante en pratiquant deux injections simultanées de BCG dans le tissu sous-cutané. Nous observions, en effet, que les enfants présentaient une cuti-réaction positive au bout de six semaines environ et nous obtenions ainsi une

indication précise pour la durée de l'isolement des vaccinés provenant d'un milieu bacillaire.

Quoique cette méthode ait été adoptée depuis par différents auteurs, nous avons voulu répéter ces expériences à Saïgon. Dans ce but, nous avons vacciné un total de 238 sujets européens et annamites, âgés de six mois à vingt-six ans (notamment des enfants de deux à quatorze ans), vivant dans un milieu apparemment non tuberculeux. Ces sujets furent éprouvés préalablement à la tuberculine, souvent pendant trois semaines, à trois ou quatre reprises (cuti-réactions et Mantoux jusqu'à 1 centigramme de tuberculine brute) et tous se montrèrent anergiques avec les réactions employées. Nous utilisons pour nos cuti-réactions une technique plus sensible (combinant la cuti-réaction de Pirquet à la réaction percutanée de Moro-Hamburger qui a été décrite dans un travail antérieur) [5].

Ces 238 sujets furent divisés en deux groupes comprenant chacun un nombre sensiblement égal de sujets du même âge. Le groupe I fut vacciné dans le tissu sous cutané, à la hauteur de l'omoplate gauche, par une seule injection de 0 milligr. 01 de BCG (volume de l'émulsion : 1 cent. cube). Pour le groupe II, la même dose de BCG fut administrée en deux injections simultanées de 0 milligr. 005 chacune dans le tissu sous-cutané à la hauteur des deux omoplates : (au total : 0 milligr. 01 ; volume de l'émulsion : 1 cent. cube). Le BCG qui servit à ces vaccinations, préparé six jours auparavant avec des cultures âgées de dix-huit jours, avait été conservé au frigidaire (température maxima : + 7°) jusqu'au moment de l'injection.

Sept semaines plus tard, 168 vaccinés seulement se sont présentés au laboratoire pour le contrôle de l'allergie : 77 du groupe I et 91 du groupe II. En vue de simplifier la recherche de l'allergie post-vaccinale, nous n'avons éprouvé ces sujets que par une unique cuti-réaction. Il est évident qu'en employant la réaction de Mantoux jusqu'à 1 centigramme de tuberculine nous aurions trouvé un nombre d'allergiques encore plus élevé.

56 vaccinés du groupe I (72,7 p. 100) et 84 du groupe II (92,3 p. 100) réagissaient nettement à la cuti-réaction sept semaines après la vaccination. 1 enfant du groupe I (1,3 p. 100) et 1 enfant du groupe II (1,1 p. 100) ont fait par la suite

TABLEAU I.

GROUPE I							GROUPE II						
77 SUJETS VACCINÉS PAR 1 INJECTION Sous-CUTANÉE DE 0 MILLIGR. 01 DE BCG							91 SUJETS VACCINÉS PAR 2 INJECTIONS SOUS- CUTANÉES SIMULTANÉES DE 0 MILLIGR. 005 DE BCG						
Age	Nombre de sujets	Cuti-réactions après 7 semaines				Absès froid	Age	Nombre de sujets	Cuti-réactions après 7 semaines				Absès froid
		Fortes	Moyennes	Faibles	Négatives				Fortes	Moyennes	Faibles	Négatives	
6 mois .	1				1		6 mois .	4	3	1			
1 an . .	2	1			1		1 an . .	9	7	2			1
2 ans . .	4	2			2		2 ans . .	8	7	1			
3 ans . .	8	2	5	1			3 ans . .	8	2	4		2	
4 ans . .	11	2	5	1	3		4 ans . .	6	2	3			
5 ans . .	3	2		1			5 ans . .	9	2	4	1	2	
6 ans . .	6		2	1	3		6 ans . .	8	2	3	2	1	
7 ans . .	6	2		1	3		7 ans . .	9	2	4	1	2	
8 ans . .	13	2	5	2	4		8 ans . .	5	2	2	1		
9 ans . .	3		3				9 ans . .	5	3	1	1		
10 ans . .	7	1	3	1	2		10 ans . .	4		2	2		
11 ans . .	3			3			11 ans . .	2	2				
12 ans . .	5	2	1	1	1		12 ans . .	6	1	4	1		
13 ans . .	3		2		1	1	13 ans . .						
14 ans . .							14 ans . .	3		1	2		
16 ans . .							16 ans . .	1	1		1		
17 ans . .							17 ans . .	1		1			
19 ans . .							19 ans . .	1		1			
21 ans . .	1		1				21 ans . .						
24 ans . .							24 ans . .	1	1				
26 ans . .	1	1					26 ans . .	1		1			
Total . .	77	17	27	12	21	1	Total . .	91	36	35	13	7	1
Pourcentage .		22,1	35	15,6	27,3	1,3	Pourcentage		39,5	38,5	14,3	7,7	1,1
Positifs : 72,7 p. 100; Négatifs : 27,3 p. 100.							Positifs : 92,3 p. 100; Négatifs : 7,7 p. 100.						

un petit abcès froid. Nous indiquons, dans le tableau qui suit, l'intensité des cuti-réactions observées.

En ce qui concerne l'intensité des cuti-réactions notée dans ce tableau et dans les suivants, il faut tenir compte du fait que les réactions positives dues au BCG se montrent bien moins fortes que celles consécutives aux contaminations par du bacille de Koch virulent. Les annotations « fortes », « moyennes », etc., sont donc à considérer uniquement au

point de vue réactions dues au BCG. En outre, nous avons remarqué que chez les enfants prémunis par le BCG, la réaction de Moro-Hamburger se révèle, en général, beaucoup plus sensible que celle de Pirquet, mais quelques rares vaccinés ne réagissent qu'au Pirquet. Nous pensons donc qu'il y a intérêt à employer la technique que nous pratiquons, qui est une combinaison des réactions de Pirquet et de Moro-Hamburger [5]. Les sujets européens et annamites ayant réagi d'une façon identique, nous ne tenons pas compte des différences de races dans nos tableaux.

Nous avons procédé de même pour revacciner 89 enfants, de milieu apparemment indemne de tuberculose, qui avaient reçu après leur naissance 3 centigrammes de BCG *per os*, et qui ne réagissaient pas à une intradermo-réaction de 1 centigramme de tuberculine brute. Ces enfants furent également divisés en deux groupes. Une moitié fut revaccinée par une injection unique (groupe III), l'autre par deux injections simultanées (groupe IV). Nous n'avons eu l'occasion de revoir pour le contrôle de l'allergie que 65 de ces revaccinés (26 du groupe III et 39 du groupe IV).

Sept semaines après leur revaccination, 20 enfants du groupe III (76,9 p. 100) et 35 du groupe IV (89,75 p. 100) réagissaient nettement à la cuti-réaction. Mais le nombre des abcès froids a été élevé dans les deux groupes : 3 pour le groupe III (41,5 p. 100) et 4 pour le groupe IV (10,25 p. 100).

Il apparaît donc, aussi bien chez les primo-vaccinés que chez les revaccinés, que la méthode des deux injections simultanées provoque une allergie plus précoce et plus intense que l'injection unique. On constate, en outre, que le nombre des abcès froids est bien plus élevé, dans les deux groupes, chez les revaccinés que chez les primo-vaccinés. Nous pensons que cela provient du fait que l'immunité peut persister après vaccination *per os* chez certains enfants malgré qu'ils ne réagissent pas à un Mantoux de 1 centigramme de tuberculine et que les abcès observés chez les revaccinés sont pour la plupart dus à des « phénomènes de Koch ». En effet, exception faite pour le revacciné âgé de quatre ans (un de nos premiers cas européen chez lequel nous n'avions recherché l'allergie avant la revaccination que par 3 cuti-réactions à une semaine d'intervalle,

TABLEAU II.

GROUPE III							GROUPE IV						
26 SUJETS REVACCINÉS PAR 1 INJECTION SOUS-CUTANÉE DE 0 MILLIGR. 01 DE BCG							39 SUJETS REVACCINÉS PAR 2 INJECTIONS SOUS- CUTANÉES SIMULTANÉES DE 0 MILLIGR. 005 DE BCG.						
Age	Nombre de sujets	Cuti-réactions après 7 semaines				Abeès froids	Age	Nombre de sujets	Cuti-réactions après 7 semaines				Abeès froids
		Fortes	Moyennes	Faibles	Négatives				Fortes	Moyennes	Faibles	Négatives	
1 à 6 mois.	1		1				1 à 6 mois.	3	2		1		3
1 an. . .	5	3	1	1	1	1	1 an. . .	5	2	3			
2 ans . .	5	1	2	1		1	2 ans . .	6	1	4	1	1	1
3 ans . .	2		1	1	4		3 ans . .	4	2	1		1	
4 ans . .	8		3	1		1	4 ans . .	3		3			
5 ans . .							5 ans . .	6	1	3	2		
6 ans . .	1		1		1		6 ans . .	3	1	1		1	
7 ans . .	3	1		1			7 ans . .	2	1	1			
8 ans . .	1		1				8 ans . .	6	1	4		1	
Total. .	26	5	10	5	6	3	Total. .	39	11	20	4	4	4
Pourcentage		19,2	38,5	19,2	23,1	11,5	Pourcentage		28,2	51,3	10,25	10,25	10,25
Positifs : 76,9 p. 100; Négatifs : 23,1 p. 100.							Positifs : 89,75 p. 100; Négatifs : 10,25 p. 100.						

ce qui était insuffisant, tous les abcès froids notés se sont uniquement formés chez des revaccinés âgés de 40 jours à deux ans, c'est-à-dire, chez de tout jeunes enfants ayant absorbé du BCG *per os* relativement peu de temps auparavant. Il est d'ailleurs probable que, si nous avions employé pour le Mantoux des doses de tuberculine encore plus fortes que le centigramme, nous aurions pu déceler avant la revaccination d'autres allergiques parmi ces enfants. Il nous semble donc préférable de n'effectuer dorénavant les revaccinations, jusqu'à l'âge d'environ deux ans, que par voie buccale ou, plutôt, de rechercher l'allergie avant l'injection sous-cutanée de BCG par intradermo-réactions à des doses de tuberculine allant jusqu'à 2 centigrammes.

Parmi ces 233 primo-vaccinés ou revaccinés par voie sous-cutanée et contrôlés au point de vue allergie sept semaines

après l'injection de BCG, nous n'avons pu revoir que 43 sujets douze à dix-huit mois plus tard (ce qui ne doit pas étonner, car aux Colonies les Européens et les Indigènes changent fréquemment de domicile et il est difficile de les retrouver).

20 (groupe V) n'avaient été vaccinés que par une seule injection sous-cutanée de 0 milligr. 01 de BCG et 23 (groupe VI) avaient reçu deux injections simultanées de 0 milligr. 005. Dans le tableau qui suit nous indiquons l'intensité des cuti-réactions que ces sujets avaient présentées sept semaines après l'injection du BCG, et on voit nettement que les cuti-réactions diminuent d'intensité douze à dix-huit mois après la vaccination, ce qui prouve que l'allergie était dans la majorité des cas bien due au BCG et non à une surinfection virulente.

TABLEAU III.

GROUPE V					GROUPE VI				
20 SUJETS VACCINÉS PAR 1 INJECTION SOUS-CUTANÉE DE 0 MILLIGR. 01					23 SUJETS VACCINÉS PAR 2 INJECTIONS SOUS-CUTANÉES SIMULTANÉES DE 0 MILLIGR. 005 CHACUNE.				
Cuti-réaction					Cuti-réaction				
Intensité	Fortes	Moyennes	Faibles	Négatives	Intensité	Fortes	Moyennes	Faibles	Négatives
7 semaines après vaccination	8	8	2	2	7 semaines après vaccination	8	12	3	
12 à 18 mois après vaccination	2	11	4	3	12 à 18 mois après vaccination	3	11	5	4
Pourcentage 12 à 18 mois après vaccination	10	55	20	15	Pourcentage 12 à 18 mois après vaccination	13	48	22	17
Positifs à la cuti-réaction : 85 p. 100. Positifs au Mantoux de 1 centigr. : 95 p. 100.					Positifs à la cuti-réaction : 83 p. 100. Positifs au Mantoux de 1 centigr. : 95,7 p. 100.				

Il apparaît donc que, pour la vaccination par la voie sous-cutanée en général, très peu de sujets ont perdu leur allergie due au BCG douze à dix-huit mois après l'inoculation. En effet, 15 p. 100 du groupe V et 17 p. 100 du groupe VI ne réagissaient pas à la cuti-réaction à cette date, mais, après une

deuxième épreuve par un Mantoux de 1 centigramme de tuberculine, le pourcentage des anergiques s'est abaissé à 5 p. 100 pour le groupe V et à 4,3 p. 100 pour le groupe VI. Donc, douze à dix-huit mois après la vaccination, 2 seulement des 43 sujets revus ne réagissaient pas au Mantoux de 1 centigramme (4,6 p. 100). Il est donc fort probable que la plupart des individus vaccinés par voie sous-cutanée resteront immunisés pendant plusieurs années.

Les résultats que nous avons obtenus à Saïgon confirment donc entièrement ceux que nous avons observés à Strasbourg en 1929 [9], à savoir qu'au point de vue sensibilité tuberculinique post-vaccinale la voie sous-cutanée est nettement supérieure à la voie buccale et qu'à doses égales de BCG la méthode des deux injections sous-cutanées simultanées provoque l'apparition de l'allergie d'une façon plus précoce, plus intense et plus régulière qu'une unique injection de BCG.

D'ailleurs, Moreau, Bauza et Cantonnet Branch, à Montevideo (cités par Saënz [10]¹, qui ont adopté notre méthode pour leurs vaccinations sous-cutanées, notent « qu'avec cette technique les abcès ont presque totalement disparu et que l'allergie s'installe généralement après six semaines à trois mois ». Lavergne, à Hué (Annam) [11], constate « que le chiffre des abcès froids devient nettement plus faible » depuis qu'il vaccine par deux injections sous-cutanées simultanées. Et tout récemment encore, R. Debré, à Paris [12]¹, en employant ce mode de vaccination chez 140 enfants, âgés de un à quatre ans, observe par intradermo-réactions (0 milligr. 1 à 1 centigramme de tuberculine) l'apparition précise et constante de la sensibilité tuberculinique après six semaines sans complications d'abcès froids post-vaccinaux.

La méthode des deux injections sous-cutanées simultanées semble donc donner actuellement les meilleurs résultats dans la vaccination au BCG des sujets de tout âge. L'allergie à la tuberculine, décelable par simple cuti-réaction, apparaît, en général, régulièrement au bout de six à huit semaines et l'abcès froid devient une complication rare si l'on tient compte des indications suivantes : ne vacciner que des sujets nettement allergiques au Mantoux d'au moins 1 centigramme de tuberculine, ne pas utiliser des doses trop fortes de BCG, ni une émul-

sion vaccinale imparfaitement homogène et, enfin, ne pas traumatiser ou ponctionner trop hâtivement la petite infiltration qui ne se forme d'habitude qu'à l'un des deux points d'injection du vaccin.

En effet, on observe vers la troisième ou quatrième semaine après les deux injections de BCG, qu'un côté, tantôt le gauche, tantôt le droit, commence à s'infiltrer, tandis qu'à l'autre point d'injection on ne sent en général à la palpation qu'un minuscule nodule. Cette infiltration sous-cutanée, non adhérente à la peau, peut augmenter de volume, pendant environ une à trois semaines, pour arriver à un diamètre de 1 à 3 centimètres. Puis elle régresse plus ou moins rapidement et ne forme, vers la huitième ou neuvième semaine, qu'un nodule dur, arrondi, plutôt plat, non adhérent à la peau, de 0,5 à 1 centimètre de diamètre. L'autre point d'injection reste souvent sans infiltration. Ces nodules diminuent petit à petit de volume et disparaissent finalement après un temps plus ou moins long. Les infiltrations ne sont jamais douloureuses et ne donnent que rarement naissance à un abcès froid. Quand l'abcès froid se produit, l'infiltration augmente légèrement de volume, elle devient fluctuante et plus saillante et la peau prend une coloration rouge ou violacée. Mais même arrivés à ce stade, nous avons vu quelquefois des abcès régresser soit spontanément, soit après exposition prudente, pendant plusieurs semaines, aux rayons ultra-violets ou aux rayons solaires. Il ne faut donc pas ponctionner trop hâtivement. Si l'abcès, qui est toujours indolore, évolue, il peut se vider spontanément, ou bien il nécessite une ou deux ponctions. Ces ponctions doivent être pratiquées avec de grosses aiguilles et l'aspiration du pus doit être douce, car la paroi interne de l'abcès saigne facilement. La guérison s'effectue sans traitement (pansements secs), en général après un mois, et il ne reste qu'une petite cicatrice cutanée, lisse, punctiforme, non adhérente aux plans profonds qui ne se remarque quelquefois même plus du tout environ un an plus tard.

D'après l'avis des parents, même quand un abcès se forme, la vaccination au BCG par les deux injections sous-cutanées ne présente guère plus d'inconvénients que la vaccination antivaricelleuse. En effet, l'abcès froid n'est pas douloureux et n'a

aucun retentissement sur l'état général de l'enfant. Il guérit sans laisser de cicatrice nettement visible. Aussi, jusqu'à présent n'avons-nous pas rencontré de familles qui aient refusé la vaccination au BCG par la voie sous-cutanée bien que nous les prévenions toujours que cette vaccination pouvait être suivie d'une légère complication sous la forme d'un petit abcès froid. Nous sommes convaincus que les parents accepteront, en général, pour leurs enfants la vaccination sous-cutanée par deux injections si on leur explique les avantages manifestes de cette méthode sur la prémunition par voie buccale.

Aussi, estimons-nous que tous les enfants de milieu tuberculeux ou simplement suspect devraient être vaccinés par la méthode des deux injections sous-cutanées simultanées. Cette technique est beaucoup plus précise que la vaccination *per os* et même que la vaccination par une simple injection sous-cutanée. Elle est suivie de l'apparition plus précoce et plus constante de l'allergie tuberculinique, décelable par simple cuti-réaction. Le médecin saura ainsi exactement quand le vacciné pourra être remis sans danger dans son milieu bacillaire, c'est-à-dire en pratique, six à huit semaines après la vaccination.

B. DOSES DE BCG A EMPLOYER ET VARIATIONS DE LA VIRULENCE DU BCG POUR L'ESPÈCE HUMAINE. — Une question très importante dans la vaccination au BCG par la voie sous-cutanée est celle de la dose de BCG à employer.

Classiquement, on recommande pour la vaccination sous-cutanée l'injection de 0 milligr. 01 de BCG jusqu'à l'âge de quinze ans et de 0 milligr. 02 pour les sujets plus âgés. Or, cette dose est souvent nettement insuffisante. A Strasbourg, par exemple, nous n'obtenions des résultats satisfaisants, au point de vue allergie tuberculinique, dans la vaccination par la voie sous-cutanée, qu'en injectant 0 milligr. 05 de BCG. Aussi, arrivés à Saïgon, avons-nous voulu vacciner avec les mêmes doses. Mais, rapidement, nous avons dû nous rendre à l'évidence que 0 milligr. 05 représentaient une dose trop forte pour Saïgon. Depuis, nous utilisons la dose de 0 milligr. 01 qui nous donne de bons résultats. A ce sujet, il est intéressant de noter que pour le cobaye — comme l'a déjà fait remarquer

A. Wallgren [13] — la virulence du BCG ne semble guère varier. En effet, chez ces animaux, les lésions bénignes provoquées par les inoculations de contrôle du vaccin restent sensiblement les mêmes pour tous les expérimentateurs.

D'où proviennent ces variations de la virulence du BCG pour l'espèce humaine? Les variations de virulence du vaccin BCG peuvent être dues, d'abord, à la préparation du vaccin, ensuite à l'éloignement de la localité où on vaccine du centre de préparation du BCG.

En effet, quoique l'Institut Pasteur de Paris ait donné des instructions précises pour la fabrication du vaccin BCG, les bactériologues qui préparent ce vaccin dans les différents pays ne procèdent pas toujours d'une façon strictement identique. D'autre part, en général, on ne pèse actuellement plus les cultures de BCG qui sont destinées à la préparation du vaccin. On admet pour chaque ballon un poids moyen. Or, il arrive que le BCG se développe moins bien dans une série de ballons. Le résultat sera que le vaccin fait avec le BCG contenu dans ces ballons se trouvera être moins riche en germes, donc moins actif.

En outre, le liquide qui sert à la dilution des cultures de BCG dans la fabrication du vaccin peut avoir une influence sur la conservation de la virulence du BCG et la composition de ce liquide varie quelquefois d'un Institut à l'autre. (D'après des expériences que nous avons effectuées et que nous publierons sous peu, le liquide de dilution qui nous paraît le plus indiqué est le Sauton dilué au quart).

Mais, ce qui est plus important : tous les Instituts n'emploient pas des cultures de BCG du même âge pour préparer leurs vaccins. Les uns feront du vaccin BCG avec des cultures de dix-huit à vingt jours, les autres prendront des cultures de vingt-cinq jours ou plus. J. Heimbeck, par exemple [14], se sert habituellement de vaccin BCG préparé avec des cultures âgées de dix à vingt jours et il a même utilisé des cultures de quarante-cinq jours. Il n'est pas étonnant que cet auteur constate des variations dans la virulence de son vaccin. Des cultures de dix, de vingt ou même de quarante-cinq jours ne donneront pas des vaccins de vitalité et de virulence égales.

Il y aurait un très grand intérêt à ce que tous les Instituts

qui fabriquent du vaccin BCG adoptent une technique rigoureusement uniforme et cela, dans les plus petits détails.

En outre, les résultats des auteurs qui expérimentent le BCG sur l'espèce humaine semblent souvent varier, sans que la virulence du BCG soit en cause, du fait que l'allergie tuberculinique est recherchée avec des techniques différentes. Les uns emploient pour leurs cuti-réactions de la tuberculine diluée au quart, les autres se servent de tuberculine brute pure, et R. Debré, par exemple, considère comme allergiques les vaccinés au BCG qui ne réagissent que d'une façon douteuse à un Mantoux de 1 centigramme de tuberculine brute [4]. Là encore, nous pensons qu'il y aurait avantage à ce que tous les auteurs adoptent pour les recherches de l'allergie une technique identique.

Mais, même en admettant que tous les Instituts préparent un vaccin BCG strictement égal à tous les points de vue, ce vaccin n'aurait pas la même virulence partout où il serait employé. Prenons le vaccin BCG de l'Institut Pasteur de Paris. Utilisé à Paris même, ce vaccin, d'après une communication verbale de notre regretté maître A. Calmette, paraît provoquer par voie sous-cutanée à la dose de 0 milligr. 01 assez régulièrement une cuti-réaction positive chez les vaccinés. Mais déjà, Parisot et Saleur [15], à Nancy, qui reçoivent le BCG de Paris, n'obtiennent par l'injection de 1/100^e et 1/60^e de milligramme de BCG que 62 p. 100 d'allergiques par cuti- et intradermo-réactions entre trois semaines et vingt-sept mois. Nous-mêmes, à Strasbourg [16], nous étions obligés d'employer 0 milligr. 03 du même vaccin pour voir apparaître chez nos vaccinés par voie sous-cutanée l'allergie par cuti-réaction après six à huit semaines. Et H. Buschmann [17], qui vaccinait à Bleialf, en Allemagne, également avec le vaccin de l'Institut Pasteur de Paris, injectait 0 milligr. 8 de BCG et ne constatait, par cuti-réaction pendant une période de deux à sept mois, que 44,9 p. 100 d'allergiques. Et quoiqu'il inoculât aux enfants 80 fois la dose employée à Paris, il n'observait que 30 p. 100 d'abcès froids. Le même vaccin subit donc une atténuation progressive qui est en rapport avec la distance entre le lieu d'utilisation et le centre de préparation de ce vaccin.

Quel est le facteur qui produit cette atténuation dans la

virulence du BCG ? Est-ce le vieillissement du BCG ou est-ce l'exposition plus ou moins prolongée à une température trop élevée ? Nous avons demandé à notre confrère H. Buschmann de nous indiquer la durée du voyage de Paris à Bleialf. Il a bien voulu nous répondre que le vaccin BCG lui arrivait de Paris après deux à trois jours. Il est donc peu probable que le vieillissement soit responsable de l'atténuation du BCG, puisqu'à Saïgon nous n'utilisons pour nos vaccinations sous-cutanées que du BCG provenant, il est vrai, de cultures âgées de dix-huit jours, préparé six jours auparavant et conservé entre temps au frigidaire (+ 7° maxima). Nous pensons plutôt que c'est le facteur « température » qui a une action néfaste sur la vitalité et la virulence du BCG. En effet, le vaccin de l'Institut Pasteur de Paris est expédié par voie ferrée et reste donc un temps plus ou moins long à une température probablement trop élevée pour la bonne conservation du BCG, et cela même en hiver, car les fourgons postaux sont chauffés.

Il est également possible que l'âge des cultures qui servent à la fabrication du vaccin ait une influence sur la bonne conservation du BCG, et que du vaccin préparé avec des cultures de dix-huit jours, par exemple, se montre plus résistant qu'un vaccin fait avec des cultures de trente jours.

A ce sujet, il est intéressant de noter que le BCG de l'Institut Pasteur de Paris administré par la voie buccale donne, par contre, aussi bien à Paris qu'à Nancy, Strasbourg, ou Bleialf, sensiblement le même résultat au point de vue allergie tuberculinique, c'est-à-dire qu'on constate partout qu'environ 30 p. 100 des nouveau-nés vaccinés réagissent à la cuti-réaction entre huit semaines et six mois. Comment concevoir le fait paradoxal qu'injecté sous la peau, le BCG semble diminuer de virulence plus on s'éloigne du centre de préparation du vaccin et qu'administré *per os*, sa virulence reste partout égale ? Ce fait semble confirmer l'hypothèse émise par nous plus haut que la faculté d'absorption du BCG par le tube digestif et par son système lymphatique est limitée et que, sur les 3 centigrammes de BCG ingérés, l'organisme ne peut en réalité en retenir qu'une petite quantité. Donc, si une partie des 3 centigrammes du BCG a perdu sa vitalité, ou a diminué de virulence du fait du transport, il restera probablement

encore un nombre très suffisant de germes BCG virulents, vu la capacité limitée d'absorption du tube digestif. Sinon, comment expliquer aussi que H. Buschmann, à Bleialf, n'observe une cuti-réaction positive que chez 44,9 p. 100 de ses vaccinés par voie sous-cutanée malgré l'emploi de 0 milligr. 8 de BCG, tandis que chez ses vaccinés *per os* (3 centigrammes), il note, pendant la même période d'observation de deux à sept mois, 29,1 p. 100 d'allergiques par cuti-réaction, c'est-à-dire un chiffre normal (W. Park à New-York : 26 p. 100 ; Jakhnis à Kharkoff : 30 p. 100 ; nous-même à Strasbourg : 26,8 p. 100 [16] ?

On ne peut donc pas recommander pour la vaccination au BCG par la voie sous-cutanée une dose d'inoculation uniforme, applicable dans le monde entier. Les expérimentateurs pouvant se procurer leur vaccin BCG au centre même de préparation et procéder tout de suite aux vaccinations, auront en général de bons résultats avec 0 milligr. 01 de BCG, surtout s'ils emploient la méthode des deux injections simultanées. Les médecins, par contre, qui n'auront à leur disposition que du BCG, soit préparé avec des cultures âgées, soit ayant subi un voyage plus ou moins long, devront rechercher sur place la dose d'inoculation optima pour leurs vaccinations sous-cutanées et cette dose sera, en général, supérieure à 0 milligr. 01. Enfin, le vaccin BCG devra toujours être conservé en glacière ou au frigidaire, et on cherchera à éviter, autant que possible, son exposition à la température ordinaire. Il nous paraît inutile d'augmenter la dose de BCG pour la vaccination sous-cutanée des adolescents ou adultes anergiques. La dose de 0 milligr. 01 que nous employons chez les enfants en bas âge nous a donné au point de vue allergie des résultats identiques chez les quelques adolescents et adultes que nous avons eu l'occasion de vacciner.

Il est évident que l'individualité constitutionnelle de chaque sujet peut intervenir au point de vue de l'apparition de l'allergie tuberculinique après vaccination par le BCG. Mais les résultats réguliers que nous observons après la vaccination au BCG par deux injections sous-cutanées simultanées nous portent à croire que ce facteur a moins d'importance que ne le pense par exemple A. Wallgren [13], et que les grandes variations de l'allergie observées dans un groupe d'enfants vaccinés

avec le même vaccin sont le plus souvent dues, soit au mode d'administration du vaccin, soit à une émulsion vaccinale imparfaitement homogène.

Donc, toutes les causes de variations de virulence que nous venons d'énumérer ne sont dues qu'à des différences de technique dans la préparation du vaccin BCG ou à une utilisation du BCG dans des conditions défavorables. Ces variations de virulence ne proviennent pas de la souche BCG même.

CONCLUSIONS.

La prémunition par le BCG *per os*, méthode simple, inoffensive et efficace, présente l'inconvénient de ne provoquer que tardivement et irrégulièrement l'allergie à la tuberculine chez les individus vaccinés. Or, la sensibilité tuberculinique est actuellement le seul test qui permet d'affirmer que le sujet vacciné a retenu des germes BCG et qu'il se trouve, de ce fait, immunisé. D'autre part, il est absolument indispensable, si l'on veut obtenir une prémunition efficace, que le vacciné soit isolé de tout contact tuberculeux jusqu'à l'apparition de l'immunité. En l'absence de l'allergie post-vaccinale, il est donc impossible de savoir quand le sujet vacciné se trouve réellement prémuni. Cette incertitude devient angoissante quand il s'agit de remettre, après vaccination, un enfant dans son milieu bacillaire. Il nous paraît donc préférable d'employer pour les sujets provenant d'un milieu tuberculeux ou suspect une autre voie d'administration du BCG qui provoquerait plus précocement et plus régulièrement l'allergie tuberculinique et qui donnerait ainsi une indication précise et individuelle au sujet de la durée de l'isolement de chaque vacciné.

Si l'on passe en revue les autres voies d'administration du BCG actuellement en usage, on constate que les voies intra-dermique, intra-musculaire et sous-cutanée donnent au point de vue sensibilité tuberculinique des résultats supérieurs à ceux obtenus par la voie buccale. De ces trois modes d'inoculation, la voie sous-cutanée nous paraît être la plus indiquée.

En effet, la voie intra-dermique ne présente aucun avantage sur la voie sous-cutanée, ni au point de vue apparition et durée de l'allergie, ni au point de vue moindre fréquence des

lésions locales post-vaccinales. En outre, la vaccination intra-dermique nous semble, en pratique, d'une exécution moins aisée que l'injection sous-cutanée.

La voie intra-musculaire peut rendre des services pour la prémunition des enfants tuberculeux qui ne peuvent être isolés que peu de temps. En employant le mode des deux injections simultanées, l'allergie à la tuberculine apparaît par cuti-réaction, à doses égales de BCG, deux à trois semaines plus tôt qu'après vaccination sous-cutanée. Mais, comme cette voie d'inoculation semble provoquer plus souvent que la voie sous-cutanée la formation d'abcès froids post-vaccinaux, nous préférons, sauf pour les cas sus-indiqués, la voie sous-cutanée à l'injection intra-musculaire.

L'inoculation du BCG par la voie sous-cutanée, qui est actuellement après la prémunition *per os* le mode de vaccination le plus employé, présente d'abord l'avantage de produire la sensibilité tuberculinique plus rapidement et plus fréquemment que la vaccination par la voie buccale; ensuite, elle donne au point de vue allergie sensiblement les mêmes résultats chez les enfants du 2^e âge et les adolescents que chez les nouveau-nés. Par contre, on reproche à cette méthode surtout le fait qu'elle peut entraîner la formation d'un petit abcès froid, d'ailleurs inoffensif, dont l'évacuation spontanée ou par ponction est gênante. En outre, si l'on compare les résultats des différents auteurs, on constate que l'allergie post-vaccinale apparaît, même par cette voie, souvent d'une façon irrégulière.

Nous avons donc cherché à modifier la technique de la vaccination au BCG par voie sous-cutanée dans le but d'obtenir une apparition précoce et régulière de l'allergie tuberculinique tout en tâchant d'éviter, autant que possible, la formation d'un abcès froid.

De nouvelles expériences, effectuées à Saïgon, portant sur la primo-vaccination de 238 sujets, âgés de six mois à vingt-six ans (notamment des enfants de deux à quatorze ans) et sur 89 revaccinations d'enfants, âgés de un mois à huit ans, nous ont permis de confirmer les observations que nous avons faites à la Clinique infantile de Strasbourg en 1929. A savoir que la méthode des deux injections sous-cutanées simultanées provoque, à doses égales de BCG, l'apparition de l'allergie d'une

façon plus précoce, plus intense et plus régulière qu'une unique injection et que l'abcès froid devient une complication rare (environ 1 p. 100 des cas) si l'on tient compte des indications suivantes : ne vacciner que des sujets anergiques au Mantoux de 1 centigramme de tuberculine brute, ne pas utiliser des doses trop fortes de BCG, ni une émulsion vaccinale imparfaitement homogène et, enfin, ne pas traumatiser ou ponctionner trop hâtivement la petite infiltration, qui ne se forme en général qu'à l'un des deux points d'injection du vaccin et qui, presque toujours, régresse spontanément sans laisser de traces.

Aussi croyons-nous que tous les enfants de milieu tuberculeux ou simplement suspect, devraient être vaccinés par la méthode des deux injections sous-cutanées simultanées. Cette technique est beaucoup plus précise que la vaccination *per os* et même que la vaccination par une unique injection sous-cutanée. Elle est suivie de l'apparition précoce et régulière de l'allergie tuberculinique (plus de 90 p. 100 des sujets réagissent déjà à la cuti-réaction au bout de sept semaines). Le médecin sait ainsi exactement quand le vacciné peut être remis sans danger dans son milieu bacillaire, c'est-à-dire en pratique, six à huit semaines après la vaccination.

En outre, en ce qui concerne l'allergie tuberculinique post-vaccinale, nous avons pu noter les faits suivants :

Les sujets européens et annamites réagissent à tous les points de vue d'une façon identique.

Les réactions positives dues au BCG se montrent moins fortes que celles consécutives aux contaminations par du bacille de Koch virulent.

La réaction de Moro-Hamburger se révèle chez les vaccinés, dans la majorité des cas, beaucoup plus sensible que celle de Pirquet, mais quelques rares sujets ne réagissent qu'au Pirquet. Aussi utilisons-nous pour nos cuti-réactions une technique, décrite dans un travail antérieur, qui combine la cuti-réaction de Pirquet à la réaction percutanée de Moro-Hamburger.

Au bout de douze à dix-huit mois, plus de 80 p. 100 des vaccinés et revaccinés par la voie sous-cutanée présentent encore une cuti-réaction positive et environ 95 p. 100 sont encore sensibles à un Mantoux de 1 centigramme de tubercu-

line. Il est donc fort probable que la plupart des individus vaccinés par voie sous-cutanée restent immunisés pendant plusieurs années.

Pour les revaccinations effectuées par voie sous-cutanée, il faut tenir compte du fait que l'immunité peut persister après vaccination *per os* chez certains enfants malgré qu'ils ne réagissent pas à un Mantoux de 1 centigramme de tuberculine et que les revaccinations risquent de provoquer chez eux des « phénomènes de Koch » (abcès froid). Il nous semble donc préférable de n'effectuer les revaccinations, jusqu'à l'âge d'environ deux ans, que par voie buccale, ou plutôt de rechercher l'allergie avant l'injection sous-cutanée de BCG par intra-dermo-réactions à des doses de tuberculine allant jusqu'à 2 centigrammes.

En ce qui concerne la dose de BCG à employer pour la vaccination par les voies sous-cutanée et intra-musculaire, nous ne pensons pas que l'on puisse recommander une dose d'inoculation uniforme, applicable dans le Monde entier. La vitalité et la virulence du BCG subissent une atténuation progressive qui est en rapport avec la distance entre le lieu d'utilisation et le centre de préparation du vaccin. Le facteur « température » paraissant avoir la plus grande part dans cette atténuation, le vaccin BCG devra, autant que possible, être conservé en glacière ou au frigidaire. Les expérimentateurs pouvant se procurer leur vaccin au centre même de préparation et procéder tout de suite aux vaccinations, auront, en général, de bons résultats, au point de vue allergie post-vaccinale, avec 0 milligr. 01 de BCG., surtout en employant la méthode des deux injections simultanées. Les médecins, par contre, qui n'auront à leur disposition que du vaccin, préparé avec des cultures âgées ou du BCG ayant subi un voyage plus ou moins long, devront rechercher la dose d'inoculation optima et cette dose sera, en général, supérieure à 0 milligr. 01.

En outre, pour obtenir un vaccin BCG d'une virulence égale dans tous les pays, il y aurait un très grand intérêt à ce que tous les Instituts qui préparent ce vaccin adoptent une technique rigoureusement uniforme, et cela dans les plus petits détails. En effet, les atténuations de virulence du BCG, constatées par différents auteurs dans la prémunition de l'espèce

humaine, ne nous semblent pas provenir de la souche BCG même, elles nous paraissent surtout dues à des différences de technique dans la préparation ou dans l'administration du vaccin et à une utilisation du BCG dans des conditions défavorables.

BIBLIOGRAPHIE

- [1] CHAUSSINAND (R.). *La vaccination contre la tuberculose par le BCG. Expérimentation et pratique*. Préface du Professeur A. Calmette. (G. Doin et C^{ie}, éditeurs, 1931).
- [2] ROHMER (P.) et CHAUSSINAND (R.). *Bull. Soc. Méd. Hôpitaux*, Paris, **45**, n° 31, 1929, p. 1365-1367).
- [3] CALMETTE (A.). *La sensibilité tuberculinique (ou allergie). Ses rapports avec l'infection tuberculeuse et avec l'état d'immunité conférée par le vaccin BCG*. (Livre publié en hommage et dédié à la mémoire du Professeur Cantacuzène. Masson et C^{ie}, 1934, p. 103-109).
- [4] DEBRÉ (R.), LELONG (M.) et PICTET. *Ces Annales*, **49**, 1932, n° 1, p. 4-40.
- [5] CHAUSSINAND (R.). *Bull. Soc. Path. Exotique*, juin 1935.
- [6] WALLGREN (A.). *Ces Annales*, **43**, 1929, p. 799.
- [7] PARK (W.) et KERESZTURI (C.). Rapport préliminaire sur les enfants vaccinés au BCG et sur les témoins non vaccinés à New-York. *Vaccination préventive de la tuberculose de l'homme et des animaux par le BCG*. Masson et C^{ie}, 1932, p. 162-179.
- [8] CHAUSSINAND (R.). *Ces Annales*, **45**, n° 1, 1930, p. 65-70.
- [9] CHAUSSINAND (R.). *Ces Annales*, **44**, n° 4, 1930, p. 450-469.
- [10] SARNZ (A.). Vaccination préventive de la tuberculose par le BCG en Uruguay. *Vacc. prév. tuberc. BCG*. Masson et C^{ie}, 1932, p. 321-334.
- [11] LAVERGNE (J.). *Bull. Soc. Path. Exotique*, **27**, n° 7, 1934, p. 684-690.
- [12] DEBRÉ (R.), LELONG (M.) et PICTET. *C. R. Soc. Biol.*, **126**, n° 16, 1934, p. 37-39.
- [13] WALLGREN (A.). Résultats d'un essai de rationalisation de la vaccination par le BCG. *Vacc. prév. tuberc. BCG*. Masson et C^{ie}, 1932, p. 287-310.
- [14] HEIMBECK (J.). Allergie tuberculinique et vaccination anti-tuberculeuse par le BCG. *Ibidem*, p. 228-234.
- [15] PARISOT et SALEUR. Acad. Méd., 12 juin 1928. *La Presse Médicale*, n° 36, 1928, p. 758.
- [16] CHAUSSINAND (R.). *Rev. franç. Pédiatrie*, **6**, nos 3 et 4, 1930, p. 355-420 et 496-591.
- [17] BUSCHMANN (H.). *Ces Annales*, **43**, n° 7, 1929, p. 838-856.

UN NOUVEAU MILIEU DE CULTURE POUR LA PRODUCTION DE LA TOXINE DIPHTHERIQUE

par M^{lle} E.-M. TAYLOR,
Laboratoires Connaught, Toronto (Canada).

Au cours de ces dernières années, plusieurs notes et mémoires ont été publiés par Ramon [1], Loiseau et Philippe [2], Pope et ses collaborateurs [3], [4], 5], sur la production de toxines diphtériques de pouvoir antigène élevé avec des bouillons de culture qui ont ceci de commun qu'un produit de substitution remplace la peptone commerciale et que des sucres sont ajoutés au milieu. Les méthodes de ces auteurs furent étudiées en vue de mettre au point, si possible, une méthode de préparation de la toxine diphtérique moins coûteuse que celle qui est couramment employée dans nos laboratoires. Dans ce but, nous avons plus particulièrement étudié la préparation du produit de l'hydrolyse pepsique de panse de porc, l'effet de divers sucres et de la glycérine, l'influence de la surface de la culture en rapport avec le volume et l'effet de la température à laquelle étaient obtenues les cultures.

PRODUIT DE L'HYDROLYSE PEPSIQUE DE PANSES DE PORC

Pour la préparation du produit de l'hydrolyse pepsique de panse de porc, dont la première étude remonte à plus de trente-cinq ans (L. Martin), nous suivons la technique suivante :

Les panse de porc nous sont remises trois ou quatre heures après l'abatage des animaux et la préparation de la digestion est commencée de suite. Pour chaque préparation, on emploie au moins dix panse. Les panse paraissant tant soit peu anormales, c'est-à-dire celles qui sont molles ou répandent une odeur forte, et les panse vides dont la muqueuse est recouverte d'un enduit visqueux, jaunâtre, ne sont pas utilisées.

On enlève avec des ciseaux la graisse de la grande courbure de la panse et celle de la région du pyllore et du cardia.

Le reste est coupé en deux, puis rincé à l'eau tiède, afin d'éliminer les particules alimentaires adhérentes, et finalement haché avec un hache-viande.

Pour obtenir l'hydrolyse pepsique, nous avons employé des grands flacons de 4 litres, à large goulot, contenant 3.200 cent. cubes d'eau de robinet à 45°, et 32 cent. cubes d'acide chlorhydrique concentré (poids spécifique 1,18). On ajoute le hachis de panse à raison de 350 grammes par litre d'eau acidulée; le mélange est agité fortement, puis porté au bain-marie à 45°, et les goulots des flacons sont coiffés de papier. On laisse la digestion s'effectuer pendant vingt-trois heures. Durant les six dernières heures, le mélange est fortement agité à des intervalles d'environ une demi-heure. A la fin de la digestion, la petite quantité de panse non digérée est enlevée par filtration sur un tissu fin. On chauffe le liquide filtré à 95°, puis on le transvase dans de hautes bouteilles cylindriques qu'on laisse au frigorifique toute la nuit.

Une quantité considérable de précipité s'amasse au fond de ces bouteilles. On décante avec précaution le liquide surnageant ainsi que toute la graisse flottant à la surface, à l'aide d'un siphon, et on le reçoit dans un entonnoir muni d'un filtre de papier double de qualité grossière, afin d'éliminer complètement la graisse.

Pendant que le liquide filtré est encore froid, on ajuste sa concentration en ions hydrogène de 7,8 à 8,0 en employant une solution de lessive de soude à 33 p. 100 et on le laisse au bain-marie à 60° jusqu'à ce qu'un précipité floconneux s'en sépare. Quant ce précipité s'est coagulé en gros flocons, on l'élimine par filtration sur papier ou sur filtre de Seitz. La stérilisation du liquide filtré est effectuée par filtration sur filtre de Seitz à la température de 50°, ou sur bougie de Berkefeld N à 45°, ou encore par chauffage à l'autoclave à 110° pendant quarante minutes.

RAPPORT DE LA SURFACE AU VOLUME.

Une grande surface de bouillon par rapport au volume (0,7 à 2,0 cent. carrés par centimètre cube), est désirable pour la production de toxines de pouvoir antigène élevé. Comme récipient, nous avons employé des flacons rectangulaires plats, à goulot

court, de 700 cent. cubes au maximum de capacité, donnant, en position horizontale, une surface de 120 centimètres carrés.

SUCRES ET GLYCÉRINE.

Des sucres chimiquement purs, employés pour la différenciation des bactéries, ont été essayés dans les expériences des tableaux I, II, III. En ce qui concerne le maltose, nous avons constaté que des produits moins purifiés et beaucoup moins coûteux sont aussi efficaces pour la production de toxine.

Les sucres, les solutions tampons et la glycérine, dont nous avons fait l'essai avec les produits d'hydrolyse pepsique, ont été, au préalable, stérilisés par filtration sur bougie Berkefeld. On s'assura de la stérilité des milieux additionnés de ces produits en les laissant à l'étuve.

PRODUCTION DE LA TOXINE

On ensemence les bouillons stériles avec une culture de quarante-huit heures de la souche diphtérique américaine sur bouillon de Lœffler. Le pouvoir toxigène de la culture employée est vérifié en faisant à chaque essai une culture de contrôle sur un milieu peptoné, dont la valeur pour la production de la toxine est connue. Nous avons cultivé le bacille à 32-33°, sauf dans certains cas spéciaux, et pendant une période uniforme de dix jours. A la fin de cette période, des échantillons de 25 cent. cubes approximativement sont prélevés dans chaque flacon, additionnés de 0,25 c.c. de solution à 1 p. 100 de merthiolate (1). Le mélange est agité et on le laisse reposer pendant une heure ; puis les bacilles sont séparés par centrifugation. La valeur antigène intrinsèque des liquides surnageants est ensuite déterminée par la méthode de la floculation de Ramon et on mesure leur concentration en ions hydrogène par la méthode colorimétrique.

Les résultats des expériences sont résumés dans les tableaux I à VII, dans lesquels la valeur de chaque floculation représente

(1) Le merthiolate est un antiseptique très efficace ; à la concentration de 1/500, il ne modifie pas la floculation de la toxine diphtérique. (Morgan, Jamieson et Powell [6]).

soit une détermination par flacon de culture, soit une moyenne pour le nombre de flacons qui est indiqué par les chiffres entre parenthèses placés à droite de la valeur antigène intrinsèque.

TABLEAU I. — Production de toxine dans un mélange d'extrait (1) de veau et de produit d'hydrolyse pepsique en présence de diverses sources d'énergie.

HYDROLYSE 2 VOLUMES EXTRAIT DE VEAU 1 VOLUME SURFACE VOLUME = 1 CENT. CARRÉ 20 PAR C. C. TEMPS D'INCUBATION 32°	PAS DE TAMPONS		1 P. 100 D'ACÉTATE DE SOUDE		1 P. 100 DE SUCCINATE DE SOUDE	
	Unités antigènes par cent. cube	pH	Unités antigènes par cent. cube	pH	Unités antigènes par cent. cube	pH
Pas de sucre	42	9,0	22	9,5	22	9,5
	42	9,0	22	9,5	22	9,5
	45	8,6	54	8,0	72	9,4
1 p. 100 de maltose	54	8,6	72	9,2	63	9,4
	63	8,6	36	8,6	54	9,0
1 p. 100 de galactose	50	8,6	45	9,0	45	9,0
1 p. 100 de dextrine	P. C.	5,0	P. C.	5,4	36	9,2
1 p. 100 de glycérine	38	8,6	P. C.	5,4	45	9,5
0,25 p. 100 de dextrose	P. C.	5,2	P. C.	5,6	24	9,5
0,25 p. 100 de lévulose	45	8,4	P. C.	5,8	31	9,5

Nota. — P. C., indique croissance pauvre.

D'après les chiffres donnés dans le tableau I, on voit que l'addition de maltose ou de galactose au bouillon de culture, avec ou sans solution tampon, produit une augmentation sensible du pouvoir antigène de la toxine obtenue. Avec la dextrine, la glycérine, le dextrose et le lévulose, cette augmentation est moins marquée; dans certains cas, la croissance fut même entravée par l'acidité qui se développa dans le bouillon de culture.

Le tableau II montre que l'addition de maltose ou de galactose au bouillon de culture, avec ou sans solution tampon, a pour effet d'augmenter très sensiblement le pouvoir antigène de la toxine. On peut aussi noter que toutes les cultures, même

(1) L'extrait de veau dont on s'est servi fut préparé en extrayant du veau haché avec de l'acide acétique (méthode de Pope et Smith). Cet extrait additionné de 2 p. 100 de protéose peptone Difco et 0,3 p. 100 de maltose a produit de la toxine contenant 50 unités antigènes par centimètre cube.

TABLEAU II. — Production de toxine dans la solution du produit d'hydrolyse pepsique sans extrait de veau, avec des sucres ou de la glycérine.

HYDROLYSE PEPSIQUE SEULE SURFACE = 1 CENT. CARRÉ 20 VOLUME PAR C. C. TEMPS D'INCUBATION 32°	PAS DE TAMPONS		1 p. 100 D'ACÉTATE DE SOUDE		1 p. 100 DE SUCCINATE DE SOUDE	
	Unités antigènes	pH	Unités antigènes	pH	Unités antigènes	pH
Pas de sucre	< 2	8,6	8	9,5	12	9,5
	> 2	8,6	8	9,5	12	9,5
1 p. 100 de maltose	81	8,8	63	9,0	72	9,2
	81	8,8	63	9,0		
1 p. 100 de galactose	45	8,8	63	9,0	63	9,0
	54	8,8	63	9,0	72	9,0
1 p. 100 de dextrine	29	8,6	36	9,2	36	9,2
2 p. 100 de glycérine	18	8,6	35	9,3	58	9,3
0,25 p. 100 de dextrose	< 11	8,8	18	9,3	18	9,5
0,25 p. de lévulose	< 11	8,6	11	9,5	24	9,5

celles dont le pouvoir antigène est le plus faible, sont alcalines. Il semble donc que la production d'une grande acidité inscrite dans le tableau I peut être attribuée à la présence de l'extrait du veau.

En outre, on observe que l'addition soit d'acétate de soude, soit de succinate de soude, détermine une augmentation considérable de l'alcalinité.

Les valeurs de la floculation indiquées dans les tableaux I et II, sont résumées dans le tableau III. Celui-ci indique que, dans l'ensemble, le pouvoir antigène est plus marqué, et une bonne culture plus fréquente en l'absence d'extrait de veau. Le titre de floculation le plus élevé a été obtenu avec une préparation ne contenant que le produit de l'hydrolyse pepsique et du maltose. Nous fondant sur ces résultats, nous avons décidé de ne plus mélanger l'extrait de veau avec le produit de l'hydrolyse pepsique, d'abandonner également l'emploi des substances tampons et d'utiliser exclusivement le maltose comme source d'énergie.

Les essais effectués avec 22 produits d'hydrolyse pepsique de panse de porc contenant du maltose, ont montré que le pouvoir antigène des toxines ainsi préparées dépend de la méthode de stérilisation du produit de l'hydrolyse pepsique, de la con-

TABEAU III. — Comparaison de l'effet, sur la production de la toxine avec le produit d'hydrolyse pepsique de panses de porc, de l'addition, séparément ou ensemble, de sucre, d'extrait de veau, de glycérine et de tampons.

$\frac{\text{SURFACE}}{\text{VOLUME}} = 1 \text{ CENT. CARRÉ } 20$ PAR C. C. TEMPS D'INCUBATION 32°	HYDROLYSE PEPSIQUE SEULE			2 VOL. HYDROLYSE PEPSIQUE 1 VOL. EXTRAIT DE VEAU		
	Pas de tampon	1 p. 100 d'acétate de soude	1 p. 100 de succinate de soude	Pas de tampon	1 p. 100 d'acétate de soude	1 p. 100 de succinate de soude
Pas de sucre.	<< 2	8	12	12	22	22
	< 2	8	12	12	22	22
1 p. 100 de maltose	81	63	72	45	54	72
	81	63	72	54	72	63
1 p. 100 de galactose.	45	63	63	63	36	54
	54	63	72	50	45	45
1 p. 100 de dextrine	29	36	36	P. C.	P. C.	36
1 p. 100 de glycérine.	<< 7	18	31	38	P. C.	45
0,25 p. 100 de dextrose.	<< 11	18	18	P. C.	P. C.	24
0,25 p. 100 de lévulose.	<< 11	11	24	15	P. C.	31

Nota. — P. C., indique croissance pauvre.

centration du maltose, du rapport de la surface au volume et de la température de la culture. Ces résultats sont résumés dans les tableaux IV, V, VI et VII.

TABEAU IV. — Comparaison de l'effet du rapport de la surface au volume sur la production de la toxine dans deux différents produits d'hydrolyse pepsique.

MODÈLE de flacon employé	CAPACITÉ totale du flacon en centimètres cubes	VOLUME de l'hydrolyse pepsique par flacon en centimètres cubes	SURFACE VOLUME centimètre carré par centimètre cube	1,5 P. 100 DE MALTOSE	
				Hydrolyse pepsique N° 8 Unités antigènes	Hydrolyse pepsine N° 9 Unités antigènes
Cylindrique	4.000	1.000	0,35	22 29	45 63
Cylindrique.	4.000	500	0,6	40 45	72
Plat	1.100	200	0,9	54 45	72 72
Cylindrique.	450	100	0,9	54 45	72 72
Cylindrique.	450	50	1,20	54 63	81 81

Le tableau IV résume les résultats obtenus avec deux produits différents d'hydrolyse pepsique dans des modèles variés de récipients, en quantités telles que le rapport de la surface au volume de bouillon variait de 0 cent. carré 35 à 1 cent. carré 20 par centimètre cube. La tendance à la production d'une toxine plus active, quand la valeur de ce rapport est élevée, s'observe dans les deux cas.

TABLEAU V. — Effet sur la production de la toxine de différentes méthodes de stérilisation du produit d'hydrolyse pepsique et variation du rapport de la surface au volume.

VOLUME de l'hydrolyse pepsique par flacon en centimètres cubes	SURFACE (CENT. CARRÉ) VOLUME (CENT. CUBE)	PRODUIT D'HYDROLYSE pepsique 20 + 1,5 p. 100 de maltose			PRODUIT D'HYDROLYSE pepsique 21 + 1,5 p. 100 de maltose		
		Autoclave 110° 40 m.	Bougie Berkefeld	Disque Seitz	Autoclave 110° 40 m.	Bougie Berkefeld	Disque Seitz
180.	0,7		55 (4)	96 (5)	48 (4)	32 (2)	68 (3)
100.	1,2	72 (3)	80 (4)	110 (4)	55 (4)	27 (2)	55 (3)
69.	2,0		70 (4)	125 (5)	54 (4)	38 (3)	65 (3)

Nota. — Les chiffres entre parenthèses représentent le nombre de flacons qui ont servi à l'épreuve; la moyenne de la valeur antigène intrinsèque est indiquée sur le tableau.

Le tableau V permet de comparer les effets de trois différentes méthodes de stérilisation du produit d'hydrolyse pepsique, et l'effet du rapport de la surface au volume sur la production de la toxine. Bien qu'il paraisse exister une différence inhérente à l'hydrolyse pepsique n° 21 en comparaison avec le n° 20, néanmoins, dans les deux cas, la filtration du produit d'hydrolyse pepsique sur filtre de Seitz, semble se prêter à la production d'une toxine beaucoup plus active que dans le cas où la stérilisation est effectuée par les deux autres méthodes. Dans les limites étudiées ici (0 cent. carré 7 à 2 cent. carré par centimètre cube), le rapport de la surface au volume n'a pas paru avoir d'influence particulière.

Quand la stérilisation des produits de l'hydrolyse pepsique est effectuée par filtration sur bougie Berkefeld ou sur filtre de Seitz, on n'observe aucune différence dans la production de la

toxine, que le maltose ait été ajouté avant ou après la filtration.

Si la stérilisation est faite à l'autoclave, il importe de séparer le précipité, relativement faible, qui se forme après que le pH de l'hydrolyse pepsique est ajusté de 7,8 à 8,0.

Trois différents produits d'hydrolyse pepsique furent mis à l'autoclave sans séparer ce précipité; avec tous les trois, en dépit d'une abondante croissance, la valeur finale de la floculation était de moins de 2 unités par centimètre cube.

Une petite quantité de précipité se forme dans le produit de l'hydrolyse pepsique clarifié lorsqu'il est mis à l'autoclave, mais ceci ne semble avoir aucun effet nuisible sur la production de la toxine.

TABLEAU VI. — Effet sur différents produits de l'hydrolyse pepsique de la variation de la concentration du maltose et du rapport de la surface au volume.

NUMÉRO d'hydrolyse pepsique	SURFACE VOLUME = 1 CENT. CARRÉ 20 PAR CENTIMÈTRE CUBE				SURFACE VOLUME = 2 CENT. CARRÉ PAR CENTIMÈTRE CUBE			
	1 p. 100 de maltose	1,5 p. 100 de maltose	2 p. 100 de maltose	2,5 p. 100 de maltose	1 p. 100 de maltose	1,5 p. 100 de maltose	2 p. 100 de maltose	2,5 p. 100 de maltose
11 (b)	54 (1)	100 (2)	112 (2)			99 (2)	112 (2)	
12	90 (1)	100 (3)	80 (3)	63 (1)	54 (1)	88 (3)	100 (1)	
13		45 (3)	100 (1)	100 (1)		45 (1)	108 (1)	108 (1)
20 Seitz		110 (4)				125 (5)		
20 Berkefeld		80 (4)				70 (4)		
21 Seitz		55 (3)	105 (2)			65 (3)	110 (1)	
21 Berkefeld		27 (2)	60 (2)			38 (3)	52 (2)	
21 Autoclave		55 (4)	75 (2)			54 (4)	55 (2)	

Comme résultat des épreuves faites avec vingt-deux produits d'hydrolyse pepsique, on trouve que la meilleure concentration du maltose varie d'une préparation à l'autre dans les limites de 1 à 2 p. 100. Ces résultats sont résumés dans le tableau VI, où l'on peut voir que, en général, les conditions pour la production d'une toxicité maximum sont réalisées par un bouillon de culture contenant 2 p. 100 de maltose et un volume par flacon tel que le rapport de la surface au volume soit de 1 cent. carré 2 par centimètre cube. Dans la plupart des

cas, quand la concentration du maltose était 2,5 p. 100 et le rapport de la surface au volume 1 cent. carré 2 par centimètre cube, le pH final de la toxine obtenue variait de 6,0 à 7,0. Cette tendance à l'acidification fut également obtenue avec 2,5 p. 100 de maltose en diminuant le volume du bouillon par récipient à un point tel que le rapport de la surface au volume était approximativement 2 cent. carré 0 par centimètre cube, mais ni l'un ni l'autre de ces procédés n'augmenta la toxicité.

TABLEAU VII. — Effet de la filtration, de la température d'incubation et du rapport de la surface au volume sur la production de la toxine.

NUMÉRO de l'hydrolyse pepsique	HYDROLYSE PEPSIQUE par flacon en centimètres cubes	SURFACE (CENT. CARRÉ) VOLUME (CENT. CUBE)	32 A 33°		37 A 38°	
			Berkefeld 1,5 p. 100 de maltose	Seitz 1,5 p. 100 de maltose	Berkefeld 1,5 p. 100 de maltose	Seitz 1,5 p. 100 de maltose
21	180	0,1	37 (2)	68 (3)	< 2 (2)	12 (2)
	100	1,2	27 (2)	53 (3)	3 (2)	35 (2)
	60	2,0	38 (3)	65 (3)	10 (2)	55 (2)
22	100	1,2		85 (2)		75 (2)
	60	2,0		100 (2)		80 (2)

Les travaux de Pope et Smith concernant la meilleure température pour la culture, nous ont fait adopter celle de 32 à 33° dans la majeure partie des expériences résumées dans les tableaux I à VI. Dans le tableau VII, des résultats sont donnés avec deux produits différents d'hydrolyse pepsique, pour lesquels on étudia l'effet de la température d'incubation, de la méthode de stérilisation du produit d'hydrolyse et du rapport de la surface au volume. Pour le produit n° 21, on peut voir que l'effet combiné de certaines conditions, c'est-à-dire la stérilisation par filtration sur Berkefeld, température d'incubation de 37 à 38°, et un rapport de surface au volume peu élevé, a eu pour résultat une diminution de la valeur antigène intrinsèque de 68 à < 2 par centimètre cube. Seul, l'effet opposé de la température la plus haute est particulièrement frappant dans le cas de l'échantillon n° 21, stérilisé sur bougie Berkefeld. Bien que pour les échantillons 21 et 23, stérilisés

sur filtre de Seitz, les effets de la température de la culture et du rapport de la surface au volume soient loin d'être aussi frappants, ils offrent cependant cette même tendance.

On pourrait commenter la signification des valeurs antigènes intrinsèques inscrites dans les tableaux. Puisqu'il n'y a pas conformité exacte entre la valeur de la floculation d'une antitoxine et son titre antitoxique exprimé en unités d'Ehrlich (Glenny et Wallace [7]), les valeurs antigènes intrinsèques des toxines ou anatoxines, dépendent, jusqu'à un certain point, du sérum employé pour la floculation. Ceci est encore plus évident dans les résultats du tableau VIII.

TABLEAU VIII. — Comparaison des valeurs antigènes intrinsèques de trois toxines, en employant sept sérums différents.

NUMÉRO du sérum	TOXINE A Unités antigènes par centimètre cube	TOXINE B Unités antigènes par centimètre cube	TOXINE C Unités antigènes par centimètre cube
394.	54	90	97
S. S.	52	95	104
395.	53	96	105
376.	56	102	112
391.	62	111	117
399 (B)	62	112	123
399 (A)	66	114	126

Quand ce travail fut entrepris, le sérum antitoxique 399 B a été choisi pour faire l'épreuve de la floculation et on s'en servit dans tous les essais. Les résultats du tableau VIII furent obtenus quand le travail était à peu près terminé.

Le manque de concordance exacte entre la valeur de la floculation d'un sérum et son titre antitoxique exprimé en unités d'Ehrlich, rend désirable l'établissement d'un étalon international pour la floculation, soit sous la forme de sérum sec, soit sous la forme d'anatoxine sèche.

PRÉPARATION DE L'ANATOXINE

A un échantillon de toxine (préparée avec le produit de l'hydrolyse pepsique de panes de porc et du maltose, ayant

une valeur de floculation de 72 unités antigènes par centimètre cube et une D. M. L. de 0 c. c. 0004, on ajoute du formol à la concentration de 0,45 p. 100 et on laisse le mélange à 37° jusqu'à ce qu'il devienne atoxique. La valeur de la floculation de l'anatoxine résultante fut identique à celle de la toxine.

A 10 cobayes pesant de 290 à 380 grammes, on injecta, sous la peau 0 c. c. 3 (24 unités) d'anatoxine. A dix autres, on injecta 1 cent. cube (72 unités). Au bout de trois semaines, une seconde dose d'anatoxine égale à la première fut injectée, soit 0 c. c. 3 d'anatoxine aux animaux d'un groupe, et 1 cent. cube aux animaux de l'autre groupe. Cinq semaines plus tard, on titra l'antitoxine des sérums mélangés des animaux des deux groupes. On obtint 0,54 unités par centimètre cube pour les animaux qui avaient reçu deux doses de 0 c. c. 3, et 2 unités par centimètre cube pour les animaux qui avaient reçu deux doses de 1 cent. cube.

CONCLUSIONS.

Un bouillon de culture pour la production de la toxine diphtérique a été décrit, consistant seulement dans le produit de l'hydrolyse pepsique de panses de porc additionné de maltose.

Il a été démontré qu'une toxine de pouvoir antigène élevé, jusqu'à 100 unités antigènes par centimètre cube, peut être produite avec ce bouillon quand les conditions suivantes sont observées : concentration de maltose 2 p. 100, stérilisation par filtration sur filtre de Seitz, température de 32 à 33°, rapport de surface au volume 1 cent. carré 2 par centimètre cube. La concentration de la toxine produite est un peu plus faible quand la stérilisation du milieu à l'autoclave remplace la filtration sur Seitz.

Il a été démontré que la toxine préparée à l'aide de ce bouillon de culture peut être rendue atoxique par le formol, que le produit atoxique conserve sa valeur de floculation intacte et qu'il est efficace comme agent immunisant.

Je suis très heureuse de remercier M. Moloney de ses précieux conseils et de l'intérêt qu'il me témoigna pendant la rédaction de ce mémoire.

BIBLIOGRAPHIE

- [1] G. RAMON. *C. R. Acad. des Sciences*, **189**, 1929, p. 718; *C. R. de la Soc. de Biol*, **112**, 1933, p. 8.
- [2] G. LOISEAU et M. PHILIPPE. *C. R. de la Soc. de Biol.*, **112**, 1933, p. 431 et 426.
- [3] C. G. POPE et M. T. SMITH. *J. Path. Bact.*, **35**, 1932, p. 573.
- [4] C. G. POPE et M. HEALY. *Brit. J. Exp. Path.*, **14**, 1933, p. 77 et 87.
- [5] C. G. POPE. *Brit. J. Exp. Path.*, **13**, 1932, p. 207.
- [6] L. C. MORGAN, W. A. JAMIESON et H. M. POWELL. *Journ. Immunol.*, **25**, 1933, p. 121.
- 7] A. T. GLENNY et U. WALLACE. *J. Path. Bact.*, **28**, 1925, p. 317.

MILIEUX COLLOIDAUX POUR LA CULTURE DE MICROBES

par N. N. KLODNIZKY.

Le travail exposé ci-dessous fut commencé en 1927. Son principal but fut de trouver un milieu dans lequel les anaérobies pourraient se développer en présence de l'oxygène de l'air. La méthode de Tarozzi est la plus répandue et la plus connue. Elle consiste à introduire dans le bouillon ordinaire un petit fragment stérile d'un organe (rein) de lapin ou de cobaye. Noguchi employait largement ce milieu. Zeissler a montré que la combinaison-bouillon-organe peut subir la stérilisation à l'autoclave, sans qu'il en résulte aucune action nuisible à la culture ultérieure des anaérobies.

En observant la culture des anaérobies sur ce milieu, je suis arrivé à la conclusion que sa croissance commence dans le voisinage immédiat du fragment d'organe, entouré d'une zone d'autolyse et de désintégration, c'est-à-dire dans une sphère d'état colloïdal de la matière, et qu'elle ne s'étend au reste du milieu que petit à petit. Le milieu s'éclaircit après un certain temps et la croissance ne continue que dans la partie inférieure du tube. Donc, si on transforme tout le milieu à l'état colloïdal, le développement sera plus énergique et plus uniforme. On doit donc exiger du milieu qu'il soit liquide, transparent, et qu'il supporte la stérilisation à 120°.

Après plusieurs essais, je me suis arrêté à la formule suivante. On prend un bouillon de viande-peptoné, de $pH = 7,2-7,4$ et on y ajoute 0,1 p. 100 d'agar-agar. Les détails de la préparation de ce milieu sont très simples et nous ne les exposerons pas. Après filtration de la solution chaude à travers le papier, on procède à la stérilisation à 120°.

Les microbes se développent parfaitement bien sur ce bouillon-agar. Si l'ensemencement est fait comme d'ordinaire avec une pipette de Pasteur, on obtient vingt-quatre heures après une croissance abondante avec un dégagement énergique de gaz. Si on laisse la culture pendant quelques jours, il se forme

une couche transparente dans la partie supérieure du bouillon.

Il n'est pas nécessaire de régénérer le milieu, c'est-à-dire de le faire bouillir pendant dix à quinze minutes. Les milieux même laissés longtemps au laboratoire sont également bons. On peut faire des ensemencements avec une anse, c'est-à-dire avec une toute petite quantité de matériel : la culture se développe naturellement plus lentement et d'une façon moins énergique.

La formation des spores est normale, parfois même énergique ; la conservation de la culture est très grande. Des cultures du tétanos et de botulisme se sont conservées dans notre laboratoire à la température ordinaire sous l'huile pendant plus de trois années sans se dessécher. La virulence de la culture sur le bouillon-agar est plus forte que sur le bouillon ordinaire, à en juger par quelques expériences, par exemple 0 c.c. 2-0 c.c. 3 équivalent par leur action 1 cent. cube de la culture sur bouillon (*B. œdematiens* et *B. histolyticus*).

Il en est de même pour la culture du bacille de la peste après six mois de conservation au laboratoire.

La majorité des microbes pathogènes ordinaires croît très bien sur le bouillon-agar en donnant une culture typique qui souvent diffère de la culture en bouillon ordinaire.

Les aérobies stricts donnent une culture abondante, avec formation d'une pellicule épaisse ; par exemple, le bacille de la peste. Le bacille du charbon ne se développe que dans la partie supérieure, tandis que sur bouillon ordinaire le floconnement caractéristique ne se produit qu'au fond du tube. Les anaérobies facultatifs se développent progressivement dans le milieu tout entier avec prépondérance initiale dans la partie supérieure (b. typhique, b. paratyphique). La croissance du streptocoque hémolytique est caractéristique sous la forme d'un nuage ou bien d'une couche de petits grumeaux occupant la moitié supérieure du milieu et n'ayant qu'une faible tendance à augmenter. La culture des actinomycètes est très typique ; déjà en un ou deux jours il se forme dans la couche supérieure une grande quantité de granulations duveteuses qui grossissent beaucoup et s'agglomèrent. La culture en bouillon s'effectue plus lentement et seulement au fond du tube.

Le bacille de la tuberculose fait une exception. On ne

remarque pas de croissance appréciable même en présence de 3 p. 100 ou 5 p. 100 de glycérine. Ce point n'est pas encore éclairci.

Nous employons aussi avec succès le milieu liquide de Sabouraud avec 0,1 p. 100 d'agar pour cultiver et conserver les champignons pathogènes.

Si le principe que l'état colloïdal du milieu environnant offre de meilleures conditions et semble même nécessaire pour le développement des microbes est exact, il doit l'être aussi pour les microbes que l'on cultive difficilement et seulement en présence de protéines liquides. Cette hypothèse a été confirmée. Les gonocoques, pneumocoques et méningocoques se développent très bien sur le bouillon agar simple. Trois cultures de gonocoquesensemencés par moi à l'Institut Pasteur de Paris en 1928 ont supporté le voyage par chemin de fer et furent trouvées en pleine vitalité lors du nouvel ensemencement à Moscou. Le pneumocoque croît et se conserve parfois mieux que sur les milieux spéciaux. 0 c. c. 1 d'une pareille culture de cinq jours tue la souris en trente heures.

Les ensemencements de liquide cérébro-spinal ont donné à la surface une croissance nette et abondante en vingt-quatre heures, tandis que le bouillon-ascite ne donnait quelquefois une culture qu'après deux ou trois jours.

Le bacille de Pfeiffer est plus exigeant et plusieurs souches ne se sont pas développées. Il est à signaler que A. A. Spirina et E. N. Bauer ayant ajouté au bouillon-agar du sang, en procédant suivant la méthode de Leventhal, ont obtenu de très bons résultats.

Dans un cas d'ensemencement du liquide de la vésicule de vésicatoire dans un cas d'herpès récidivant, j'ai obtenu au début une culture de petits bâtonnets d'abord anaérobies, ensuite aérobies (contrôles sur milieux ordinaires). Inoculé au lapin sous la dure-mère, le bacille a provoqué une encéphalite typique transmissible en série, bien que les ensemencements soient restés stériles.

En 1928 seulement, j'ai eu la possibilité de prendre connaissance de la communication de Lignières (*C. R. Soc. Biol.*, 1923, p. 1091), qui indiquait que les anaérobies se développent bien sur agar semi-liquide (1/4 p. 100), ou bien sur la

gélatine. Il semble que Lignières ne se soit plus arrêté sur ce phénomène et qu'il n'ait pas essayé d'en donner une explication. D'autre part, dans le Manuel de Park et Williams (*Pathogen. Microorgan.*, 1925, p. 96), nous trouvons que l'agar semi-liquide ou la gélatine sont très bons pour la conservation des cultures de collections.

Outre l'agar, on a essayé l'amidon soluble, la gélatine et la gomme arabique. Ces substances se sont montrées inférieures à l'agar.

D'autre part, en ajoutant au bouillon ordinaire X ou XV gouttes d'or colloïdal, ou de manganèse, on assure le développement des anaérobies. Le fer colloïdal freine leur croissance.

L'explication du phénomène de la croissance intensive des microbes, en relation avec le milieu expérimenté, se heurte à de grandes difficultés et ne peut pas être formulée sans une étude spéciale. Je me bornerai donc à quelques considérations générales.

Probablement, ce sont les forces de la tension superficielle qui y jouent le rôle principal. Comme le milieu représente un système de haute dispersion, l'énergie superficielle doit être très grande. Le liquide intermicellaire circule entre les particules de l'agar et les substances capillaires actives s'accumulent sous la surface en diminuant l'énergie superficielle. Les particules d'agar en suspension interviennent par leur surface par des processus d'adsorption, dont le plus important représente la capacité d'adsorber l'oxygène et les ions des électrolytes. Probablement les microbes sont aussi entraînés dans ce processus. C'est pourquoi les anaérobies trouvent dans ce milieu peu d'oxygène et peuvent emprunter l'oxygène qui leur est nécessaire à la surface des micelles. Le développement spécial des autres microbes peut aussi être envisagé de ce point de vue.

Les forces d'adsorption sont de nature électrique, mais d'autres facteurs peuvent intervenir. D'après la loi de Cohen, l'eau ayant une haute constante diélectrique égale à 80, les autres particules suspendues doivent porter une charge électrique inverse, c'est-à-dire négative.

Ces corrélations peuvent subir des variations différentes

en partie provisoires, surtout pendant la période de la croissance des microbes. D'autant plus que le milieu est constitué non par de l'eau, mais par du bouillon. Enfin, chaque cellule microbienne peut être considérée comme un milieu colloïdal séparé. Il s'ensuit que les phénomènes de la stabilisation relative et de la constance des processus dans l'agar-bouillon au cours du développement des microbes sont extrêmement compliqués.

L'exemple cité ci-dessus de la culture des bacilles de Pfeiffer en bouillon-agar démontre que, dans cette direction, différentes modifications et applications sont possibles. Je me bornerai à en citer une. En 1907, j'avais proposé d'ensemencer le sang dans l'eau distillée. De nombreux auteurs allemands continuent de s'approprier avec une insistance tout à fait injuste cette méthode (« Wassermethode », Gildemeister). Depuis, je l'ai modifiée en ajoutant à l'eau 0,1 p. 100 d'agar. La présence de l'agar n'empêche pas l'hémolyse, mais la ralentit un peu. Les premières observations montrent que dans un tel milieu on obtient fréquemment la culture des bacilles du typhus abdominal là où les ensemencements de contrôle sur la bile restent sans résultat. Le milieu est moins cher et plus commode que la bile.

L'agar-bouillon, comme nous nous en sommes convaincu, est très commode pour la conservation des cultures. Les réensemencements peuvent se faire une fois tous les six mois, ou même une fois par an. Ce milieu est beaucoup plus économique que l'agar.

Le Gérant : G. MASSON.